

Aus dem Bereich der Inneren Medizin III
Klinische und Experimentelle Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg /Saar
(Prof. Dr. med. Ulrich Laufs)

Regulation endothelialer Progenitorzellen durch den dualen PPAR- alpha/gamma-Agonisten Aleglitazar

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2013

vorgelegt von:
Valérie Pavlicek
geboren am 14.12.1979
in Ostrava /Tschechien

Inhalt

1 Zusammenfassung	9
1.1 Zusammenfassung (Deutsch)	9
1.2 Summary (English)	11
2 Einleitung	13
2.1 Endotheliale Dysfunktion und Atherosklerose	13
2.2 Endotheliale Progenitorzellen	16
2.3 Rezeptoren der PPAR-Familie und ihre Agonisten	18
2.4 Fragestellung der Arbeit	22
3 Material und Methoden	24
3.1 Materialien	24
3.1.1 Chemikalien und Reagenzien	24
3.1.2 Verbrauchsmaterialien	28
3.1.3 Antikörper und Primer	29
3.1.4 Molekularbiologische Kits	31
3.1.5 Geräte und Zubehör	31
3.1.6 Software	33
3.1.7 Puffer und Lösungen	34
3.2 Methoden	39
3.2.1 Versuchstiere	39
3.2.1.1 Versuchstiere, Behandlungsgruppen und ihre Besonderheiten	39
3.2.1.2 Ermittlungen der Vitalparameter	40
3.2.1.3 Blutentnahmen	41
3.2.2 Peritonealer Glukosetoleranztest	41
3.2.3 Bestimmung der Adiponektinkonzentration (ELISA)	41
3.2.4 EPC-Quantifizierung mit der FACS-Analyse	42
3.2.4.1 FACS-Analyse der murinen EPC aus EDTA-Vollblut und Knochenmark	43
3.2.5 Zellkulturexperimente	44
3.2.5.1 Kulturbedingungen	45
3.2.5.2 Kultur endothelialer Progenitorzellen der Maus	45
3.2.5.3 Kultur humaner endothelialer Progenitorzellen	46
3.2.6 EPC-Quantifizierung mit der DiLDL/Lectin-Färbung	46

3.2.7 Migrationsassay	47
3.2.8 Koloniebildende Einheiten (<i>colony forming units</i>).....	48
3.2.9 Bestimmung der Apoptoserate humaner EPC mittels Annexin V/ Propidiumiodid-FACS.....	49
3.2.10 Disc-Neoangiogenese-Modell	50
3.2.11 Endothelfunktionsprüfung	51
3.2.12 Quantifizierung der Atherogenese.....	52
3.2.13 Telomeraseaktivitätsmessung nach dem <i>Telomere Repeat Amplification Protocol</i>	53
3.2.14 Proteinexpression und Western Blot	55
3.2.15 PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>).....	57
3.2.15.1 Semiquantitative PCR.....	57
3.2.15.2 Quantitative <i>real time</i> -PCR	59
3.2.16 Auswertung und Statistik.....	59
4 Ergebnisse	61
4.1 Auswirkungen der Aleglitazarbehandlung der C57Bl/6-WT- und ApoE ^{-/-} -Mäuse	61
4.1.1 Auswirkungen auf das Körpergewicht, Herzfrequenz, systolischen und diastolischen Blutdruck	61
4.1.2 Die Aleglitazarbehandlung normalisiert die Glukosetoleranz in ApoE ^{-/-} - Mäusen	62
4.1.3 Aleglitazar erhöht die Adiponektinkonzentration im Serum	63
4.1.4 Die Aleglitazarbehandlung erhöht die EPC-Anzahl	64
4.1.4.1 EPC-Quantifizierung mit der FACS-Analyse	64
4.1.4.2 EPC-Quantifizierung mit der DiLDL/Lectin-Färbung	65
4.1.5 Die Aleglitazarbehandlung steigert die funktionelle Kapazität der EPC (Migrationsassay).....	67
4.1.6 Die Aleglitazarbehandlung steigert die Neoangiogenese.....	68
4.1.7 Auswirkungen der Aleglitazarbehandlung auf die Endothelfunktion	69
4.1.8 Die Aleglitazarbehandlung reduziert die Bildung atherosklerotischer Läsionen in ApoE ^{-/-} -Mäusen.....	71
4.1.9 Die Aleglitazarbehandlung steigert die Expression der PPAR α -Zielgene .	73
4.2 Ergebnisse aus Zellkulturexperimenten mit humanen endothelialen Progenitorzellen	75
4.2.1 Die Aleglitazarstimulation steigert die funktionelle Kapazität der EPC	75
4.2.1.1 Migrationsassay	75

4.2.1.2 Koloniebildende Einheiten (<i>colony forming units</i>)	76
4.2.2 Aleglitazareffekte auf die Apoptoserate humaner EPC	77
4.2.3 Aleglitazar induziert die Expression der Telomerase und beeinflusst weitere Seneszenz-Proteine.....	78
4.2.3.1 Telomeraseaktivitätsmessung nach dem <i>Telomere Repeat Amplification Protocol</i>	78
4.2.3.2 Aleglitazar induziert die Phosphorylierung der endothelialen NO-Synthase und der Akt-Kinase sowie die Expression des antiapoptotischen Bcl-2 und reduziert die p53-Expression (Western Blot)	79
4.2.4 PPAR- α - und PPAR- γ - Signaltransduktionswege sind beide an den Aleglitazareffekten auf die Funktion humaner EPC beteiligt	83
4.2.4.1 Expressionsnachweis der PPAR- α und PPAR- γ in humanen EPC.....	83
4.2.4.2 Mechanismen der durch Aleglitazar vermittelten Steigerung der EPC - Funktion	83
5 Diskussion	86
6 Literaturnachweis	92
7 Danksagung und Publikationen	105
8 Lebenslauf.....	107

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

°C	Grad Celsius
μ	mikro (10 ⁻⁶)
%	Prozent
α	alpha
ACO	Acyl-CoenzymA-Oxidase
Akt	Akt-Kinase
Ale	Aleglitazar
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
APS	Ammoniumpersulfat
β	beta
Bcl-2	<i>B cell lymphoma protein-2</i>
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CaCl ₂	Calciumchlorid
cDNA	<i>copy</i> DNA
cm	Zentimeter
CPT1	Carnitin-Palmitoyl-Transferase 1
δ	delta
d	dezi (10 ⁻¹)
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
DiLDL	<i>1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyaninelabeled-acetylated LDL</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EBM	endotheliales Basalmedium
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
eNOS	endotheliale NO-Synthase

EPC	endotheliale Progenitorzelle(n)
FABP3	<i>fatty acid binding protein</i>
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorter</i>
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
γ	gamma
g, mg, µg, ng	Gramm, Milligramm, Mikrogramm, Nanogramm
h	hour(s), Stunde(n)
HDL	<i>high density lipoprotein</i>
hEGF	<i>human epidermal growth factor</i>
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
i.p.	intraperitoneal
k	kilo (10 ³)
KCl	Kaliumchlorid
kb	Kilobase(n)
KDR	<i>kinase insert domain receptor</i>
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KHK	koronare Herzkrankheit
K ₂ HPO ₄	di-Kaliumhydrogenphosphat
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
KOH	Kaliumhydroxid
l, ml, µl	Liter, Milliliter, Mikroliter
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
L-NAME	L-NG-Nitroargininmethylester
LW	Leerwert
m	Meter, milli (10 ⁻³)
M, mM, µM, nM	molar, millimolar, mikromolar, nanomolar
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute(n)
MNC	mononukleäre Zelle(n)

mol, mmol, μ mol, nmol	Mol, Millimol, Mikromol, Nanomol
mRNA	<i>messenger</i> RNA
MW	Mittelwert
n	Anzahl, nano (10^{-9})
N	Newton
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
Na ₂ HPO ₄	di-Natriumhydrogenphosphat
NO	Stickstoffmonoxid
p	p-Wert, pico (10^{-12})
pAkt	phosphorylierte Akt
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PE	Phycoerythrin
peNOS	phosphorylierte eNOS
PFA	Paraformaldehyd
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Konzentration
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PPAR	<i>peroxisome proliferator-activated receptor(s)</i>
PPRE	<i>PPAR-response-element</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	reverse Transkriptase, Raumtemperatur
RXR	Retinsäurerezeptor
s	Sekunde(n)
S.	Seite
s.c.	subkutan
Sca-1	<i>stem cell antigen-1</i>
SDF-1	<i>stroma derived factor-1</i>
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
TRF	<i>telomere repeat binding factor</i>
U	<i>Unit</i>
V	Volt

VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR-2	<i>vascular endothelial growth factor receptor-2</i>
vs.	versus
WT	Wildtyp
x	mal
z.B.	zum Beispiel

1 Zusammenfassung

1.1 Zusammenfassung (Deutsch)

Endotheliale Progenitorzellen (EPC) haben einen günstigen Einfluss auf die Endothelfunktion, steigern die Angiogenese, hemmen die Atherogenese und fördern vaskuläre Reparaturmechanismen. Die Anzahl der EPC ist ein Marker für das Risiko kardiovaskulärer Erkrankungen. Aleglitazar ist ein neuer, dual wirksamer *peroxisome proliferator-activated receptor* (PPAR)- α/γ -Agonist, der die lipid-modifizierenden Eigenschaften der PPAR- α -Agonisten (Fibrate) und die insulin-sensitivierenden Eigenschaften der PPAR- γ -Agonisten (Glitazone) verbindet. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Effekte von Aleglitazar auf humane und murine EPC sowie auf Glukosetoleranz, Endothelfunktion, Neoangiogenese und Atherosklerose in Mäusen untersucht.

C57Bl/6-Wildtyp (WT)-Mäusen (12 Wochen alt, Standardfutter) und Apolipoprotein E-*Knockout* (ApoE^{-/-})-Mäusen (10 Wochen alt, cholesterinreiches Futter) wurden täglich 10mg Aleglitazar pro kg Körpergewicht bzw. Kontrolllösung (5% DMSO in NaCl 0,9%) intraperitoneal (i.p.) injiziert. Aleglitazar hatte keinen Effekt auf Herzfrequenz, Blutdruck und Gewichtsverlauf der Tiere. Adiponektin wurde als Positivkontrolle für den PPAR- γ -Agonismus untersucht. Die Aleglitazarbehandlung führte nach drei Wochen zu einer erhöhten Serumkonzentration von Adiponektin in C57Bl/6-WT-Mäusen (360±62%, n=4, p<0,001) und in ApoE^{-/-}-Mäusen (350±121%, n=4, p<0,001). Aleglitazar bewirkte ferner eine verstärkte Expression der PPAR- α -Zielgene AcylCoA-Oxidase (ACO), *fatty acid binding protein 1* (FABP3) und Carnitin-Palmitoyl-Transferase 1 (CPT1) in der Leber der ApoE^{-/-}-Mäuse (ACO 319±43%, p<0,001; FABP3 633±60, p<0,001; CPT1 133±6%, p<0,05; alle n=7-8). ApoE^{-/-}-Mäuse unter Fettfütterung entwickelten eine pathologische Glukosetoleranz, die durch Aleglitazar normalisiert wurde. In C57Bl/6-WT-Mäusen erhöhte Aleglitazar die Anzahl Sca-1/VEGFR-2 doppelt positiver EPC in Blut (153±10%, n=6, p<0,05) und im Knochenmark (197±22%, n=6, p<0,05) und steigerte die Differenzierung DiLDL/Lectin positiver EPC in Kultur (182±8%, n=5, p<0,05). Darüberhinaus erhöhte der PPAR- α/γ -Agonist in WT-Mäusen die SDF-1 induzierte migratorische Kapazität pro EPC-Anzahl (176±6%, n=6, p<0,05) und die im Disc-Neoangiogenese-Assay

gemessene Gefäßneubildung nahezu um das Zweifache. In hypercholesterinämischen ApoE^{-/-}-Mäusen verbesserte Aleglitazar in Kultur ebenfalls die Differenzierung DiLDL/Lectin positiver EPC aus der Milz (171±6%, n=11-12, p<0,005) und die EPC-Migration (149±14%, n=6, p<0,05), die endothelabhängige Relaxation der Aorta und führte zu einer deutlichen Minderung der Ausbildung atherosklerotischer Plaques in der Aortenwurzel unter der Fettfütterung (Plauefläche/totale Fläche: Aleglitazar vs. Kontrolle 2,3±0,8% vs. 10,1±1,9%, nach 6 Wochen [n=6, p<0,05] bzw. 22,2±2,2% vs. 36±2,1%, nach 8 Wochen [n=7, p<0,01]). In kultivierten menschlichen EPC erhöhte Aleglitazar die migatorische Kapazität und die klonale Expansion der EPC dosisabhängig bereits bei 10-100nM/l, während die H₂O₂-induzierte EPC-Apoptose und die p53-Expression reduziert waren. Außerdem führte eine Aleglitazarstimulation der Zellen zu einer Aktivierung der EPC-Telomerase und einer gesteigerten Proteinexpression von phospho-Akt und phospho-eNOS^{S1177}. Kostimulationsexperimente mit Aleglitazar, Fenofibrat, Pioglitazon und pharmakologischen Inhibitoren zeigten, dass Aleglitazar seine Effekte auf EPC sowohl über den PPAR-α- als auch den PPAR-γ-Signalweg vermittelt.

Zusammengefasst erhöht der duale PPAR-α/γ-Agonist Aleglitazar in Mäusen nicht nur die Anzahl endothelialer Progenitorzellen, sondern verbessert auch ihre Funktion. Diese Effekte korrelieren mit einer gesteigerten Neoangiogenese und Endothelfunktion und sind mit einer Verminderung atherosklerotischer Läsionen und einer Normalisierung des Glukosemetabolismus assoziiert.

1.2 Summary (English)

Endothelial progenitor cells (EPC) improve endothelial function and angiogenesis, reduce atherogenesis and promote vascular repair. The number of EPC is a marker of cardiovascular disease risk. Aleglitazar is a novel dual peroxisome proliferator-activated receptor(PPAR)- α/γ agonist, which combines the lipid-modifying properties of PPAR- α agonists (fibrates) and the insulin-sensitizing properties of PPAR- γ agonists (glitazones). We studied the effects of aleglitazar on human and murine EPC and also on glucose tolerance, endothelial function, neoangiogenesis and atherosclerosis in mice.

C57Bl/6 wild-type (wt) mice (12 weeks old, standard chow) and apolipoprotein E-knockout (apoE^{-/-}) mice (10 weeks old, high-cholesterol chow) were treated with aleglitazar 10mg per kg body weight or vehicle (5%DMSO in NaCl 0.9%) by daily intraperitoneal injection. Aleglitazar showed no effects on animals heart rate, blood pressure and body weight. Adiponectin was used as positive control for PPAR- γ agonism. Aleglitazar treatment for three weeks increased serum adiponectin concentrations compared with baseline conditions in C57Bl/6 wild-type mice (360 \pm 62%, n=4, p<0.001) and apoE^{-/-} mice (350 \pm 121%, n=4, p<0.001). Furthermore, aleglitazar up-regulated the expression of PPAR- α target genes acyl-CoA oxidase (ACO), fatty acid-binding protein 1 (FABP3) and carnitine palmitoyl transferase 1 (CPT1) in apoE^{-/-} mice liver tissue (ACO 319 \pm 43%, p<0.001; FABP3 633 \pm 60%, p<0.001; CPT1 133 \pm 6%, p<0.05; each vs. controls, n=7-8). Fat-fed apoE^{-/-} mice developed impaired glucose tolerance, which was completely normalized by aleglitazar treatment. In C57Bl/6 wild-type mice aleglitazar treatment increased the numbers of sca-1/VEGFR-2 positive EPC both in the blood (153 \pm 10%, n=6, p<0.05 vs. controls) and in the bone marrow (197 \pm 22%, n=6, p<0.05 vs. controls) and the numbers of diLDL/lectin positive EPC generated by differentiation of spleen-derived mononuclear cells (182 \pm 8%, n=5, p<0.05 vs. controls). Beyond that, aleglitazar increased SDF-1 induced migratory capacity per number of EPC (176 \pm 6%, n=6, p<0.05 vs. controls) and enhanced the formation of new blood vessels in the disc-neoangiogenesis-model by almost two-fold. In hypercholesterinemic apoE^{-/-} mice aleglitazar improved the numbers of diLDL/lectin positive EPC (171 \pm 6%, n=11-12, p<0.005) and SDF-1 induced migratory capacity (149 \pm 14%, n=6, p<0.05) in culture, endothelium-dependent vasorelaxation of aortic rings and markedly reduced the

formation of atherosclerotic plaques in aortic sinus under the western type diet (plaque area/total sinus area: aleglitazar vs. controls $2.3 \pm 0.8\%$ vs. $10.1 \pm 1.9\%$, $n=6$, $p<0.05$ after six weeks or $22.2 \pm 2.2\%$ vs. $36 \pm 2.1\%$, $n=7$, $p<0.01$ after eight weeks).

In experiments with human cultivated EPC, aleglitazar in nanomolar concentrations (10-100nM/l) increased SDF-1 induced migratory capacity and colony forming capacity in a dose-dependent manner, while oxidative stress-induced apoptosis and expression of p53 were reduced. Furthermore, aleglitazar up-regulated telomerase activity in EPC and also induced eNOS and Akt phosphorylation. Comparative and inhibitor experiments revealed that the effects of aleglitazar on EPC were mediated by both PPAR- α and - γ signaling.

Taken together, the dual PPAR- α/γ agonist aleglitazar augments number and function of endothelial progenitor cells in mice which correlates with improved neoangiogenesis, restored endothelial function and prevention of atherosclerosis and normalizes glucose metabolism.

2 Einleitung

2.1 Endotheliale Dysfunktion und Atherosklerose

Herz-Kreislauf-Erkrankungen belegen in Deutschland seit Jahren die obersten Ränge der Todesursachenstatistik. Beinahe jeder zweite Verstorbene (41,1%) erlag im Jahr 2010 den Folgen einer Herz-Kreislauf-Erkrankung. Die meisten Menschen verstarben infolge einer ischämischen Herzkrankheit (33846 Männer und 38888 Frauen) und an einem akuten Myokardinfarkt (30651 Männer und 24890 Frauen), der den zweiten Platz der Todesursachenstatistik im Jahr 2010 innehatte [Statistisches Bundesamt 2012] (**Abbildung 1**).

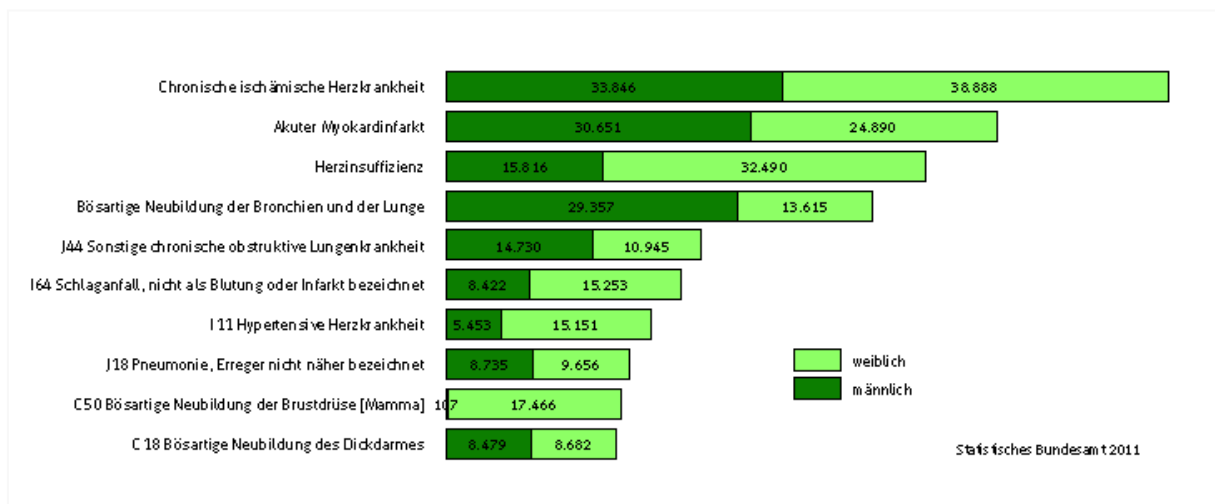


Abbildung 1:
Häufigste Todesursachen in Deutschland im Jahr 2010 [Statistisches Bundesamt 2012]

Bei der Pathogenese der Herz-Kreislauf-Erkrankungen spielt die Atherosklerose eine zentrale Rolle, deren Entstehung ein multifaktorieller Prozess zugrunde liegt. Dieser Prozess wird durch kardiovaskuläre Risikofaktoren, zu den vor allem der Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie, Dyslipidämie (hoher LDL- und niedriger HDL-Spiegel), Nikotinkonsum, Übergewicht, Lebensalter (Männer ab 45. Lebensjahr, Frauen ab 55. Lebensjahr) und eine positive Familienanamnese zählen, in einem erheblichen Ausmaß beeinflusst [Kannel 1961]. Sie beeinträchtigen ein gemeinsames Zielorgan, nämlich das Endothel und provozieren eine endotheliale Dysfunktion, die wiederum

die Entstehung atherosklerotischer Läsionen initiiert und begünstigt [Glasser 1996; Landmesser 2005; Libby 2001].

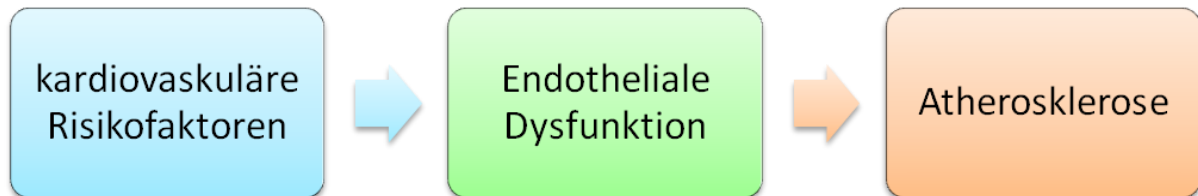


Abbildung 2:

Endotheliale Dysfunktion als Schnittstelle zwischen kardiovaskulären Risikofaktoren und Atherosklerose

Reaktive Funktionsveränderungen auf externe Stimuli, eingeschränkte endothelabhängige Vasodilatation, vermindertes Stickstoffmonoxid und vermehrte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies charakterisieren die endotheliale Dysfunktion. Neben dieser führt die chronische Schädigung (Risikofaktoren) auch zu einer dauerhaften Entzündung der Gefäßwand. Nach der sog. *response-to-injury*-Hypothese ist damit der Grundstein zur Ausbildung atherosklerotischer Läsionen gelegt [Ross 1993] (**Abbildung 3**). Bevorzugt in Regionen turbulenter Strömungsverhältnisse kommt es nun zu Einlagerungen der Lipoproteine in die *Intima* sowie deren Oxidation, die wiederum zu einer Monozytenrekrutierung führt, die zu Makrophagen differenzieren und sich durch die Aufnahme der Lipoproteine in Schaumzellen umwandeln. Diese subendothelialen Ansammlungen der Schaumzellen in diesem Frühstadium des atherosklerotischen Prozesses werden als *fatty streaks* bezeichnet. Darüber hinaus kommt es auch zu einer Migration glatter Muskelzellen in die *Intima*, die extrazelluläre Matrix produzieren, einer T-Zellaktivierung sowie Thrombozytenadhärenz und -aggregation. Weitere Lipidablagerungen, nekrotischer Untergang der Schaumzellen und Freisetzen von Wachstumsfaktoren resultieren in der Ausbildung atheromatöser Plaques mit fibröser Kappe und Verkalkungen, die hämodynamisch relevante Stenosierungen bilden können. Bei Instabilität kommt es zu einer Plaqueruptur, bei der thrombogenes Material freigesetzt wird, was zu einem Gefäßverschluss führen kann. Aufgrund der

Unterbrechung der Blutzufuhr kommt es schließlich zu einem irreversiblen Gewebeuntergang [Lusis 2000; Higashi 2009].

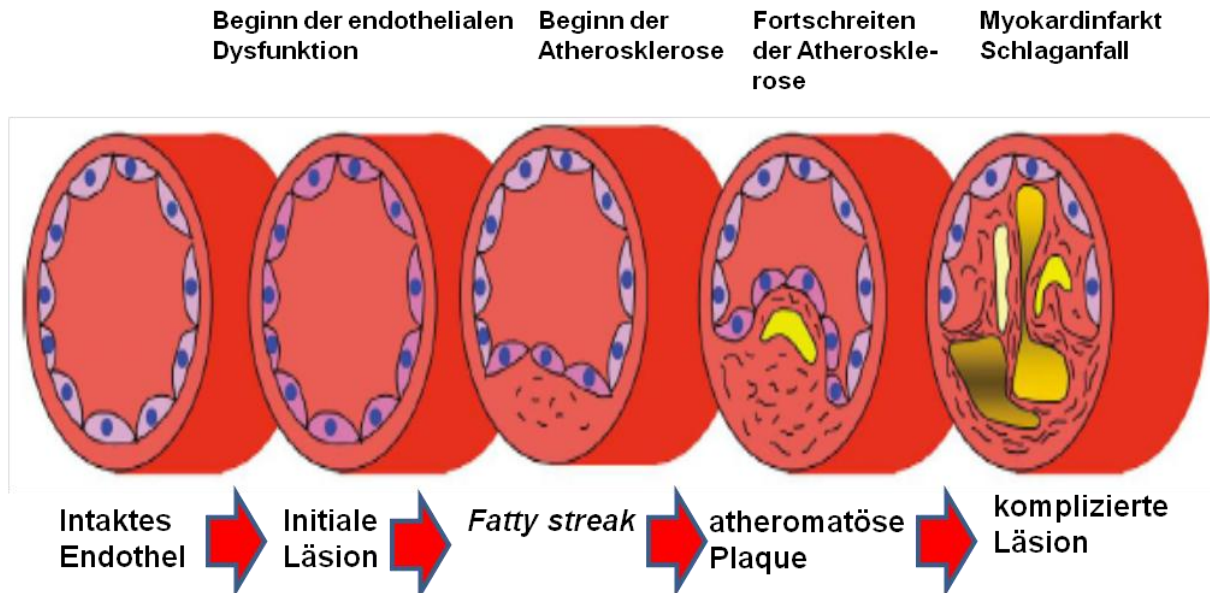


Abbildung 3:

Progression der Atherosklerose: von der endothelialen Dysfunktion zur kardiovaskulären Komplikation (modifiziert nach [Higashi 2009])

Zu den wichtigsten Manifestationsformen der Atherosklerose gehören die koronare Herzkrankheit (KHK), die zerebrovaskulären Gefäßerkrankungen und die periphere arterielle Verschlusskrankheit. Die Therapie der chronischen KHK basiert laut den aktuellen Leitlinien auf drei Säulen: dem Risikofaktoren-Management und der Prävention, der medikamentösen Therapie und der interventionellen Therapie [AWMF 2011].

In fortgeschrittenen Stadien der Atherosklerose sind die Therapiemöglichkeiten jedoch begrenzt, daher wird intensiv an neuen Ansätzen in der zellbasierten regenerativen Medizin geforscht.

2.2 Endotheliale Progenitorzellen

Dem intakten Endothel wird im Hinblick auf die Gesundheit des kardiovaskulären Systems immer mehr Bedeutung zugeschrieben. Das Gleichgewicht zwischen Endothelschaden und -reparatur ist für die Reduktion kardiovaskulärer Ereignisse von Belang [Shantsila 2007]. Reife Endothelzellen verfügen aber nur über eine begrenzte regenerative Kapazität. Daher sind endotheliale Progenitorzellen (EPC), die erstmals im Jahre 1997 durch *Asahara et al.* aus peripherem Blut isoliert werden konnten [Asahara 1997], in den Mittelpunkt wissenschaftlichen Interesses gerückt.

Das adulte Knochenmark ist reich an gewebespezifischen Stammzellen und Vorläuferzellen. Eine kleine Gruppe bilden die von hämatopoietischen Stammzellen abstammenden endothelialen Progenitorzellen, die durch verschiedene Stimuli in die Zirkulation mobilisiert werden können, um der Neoangiogenese oder der Reparatur der geschädigten Endothelzellschicht beizutragen [Asahara 1997; Lenk 2011; Urbich 2004]. Tse *et al.* haben gezeigt, dass das adulte Knochenmark in der Lage ist, nach einer Ischämie EPC freizusetzen und so eine Neovaskularisation an den Myokardgefäßen zu veranlassen [Tse 2007]. Sie tragen zu einer Gefäßprotektion bei, da sie vaskuläre Reparaturprozesse fördern und damit die Ausprägung und das Fortschreiten der endothelialen Dysfunktion und somit der Atherosklerose vermindern [Aicher 2003; Dimmeler 2001; Hill 2003; Jung 2008; Moreno 2007; Werner N 2003]. Die kardiovaskulären Risikofaktoren wie erhöhte LDL-Spiegel, arterielle Hypertonie, Rauchen [Hill 2003] und vor allem Diabetes mellitus Typ 2 [Fadini 2005] haben negative Auswirkungen auf die Anzahl und die Funktionalität der EPC. Es besteht demnach eine inverse Korrelation zwischen der EPC-Anzahl und kardiovaskulären Risikofaktoren bei gesunden Erwachsenen und bei Patienten mit einer koronaren Herzkrankheit [Vasa 2001; Hill 2003]. Die Anzahl der EPC korreliert mit der Endothelfunktion und hat in diesem Fall einen besseren Vorhersagewert als der ermittelte kombinierte Framingham Risikofaktor-Score des einzelnen Patienten [Hill 2003]. Werner N *et al.* haben in einer prospektiven Studie ebenfalls gezeigt, dass die Anzahl der EPC, die bei Patienten mit einer angiographisch nachgewiesenen koronaren Herzkrankheit gemessen worden ist, einen Prädiktor für das kardiovaskuläre Outcome darstellt. Eine niedrige EPC-Anzahl korreliert demnach unabhängig von der Schwere der koronaren Herzkrankheit mit einer erhöhten Sterblichkeit an einer kardiovaskulären Ursache [Werner N, 2005].

Charakterisierung der EPC

Die im Blut zirkulierenden EPC können in zwei Hauptkategorien eingeteilt werden, der hämatopoietischen und nicht-hämatopoietischen Linie. Während die hämatopoietischen EPC aus dem Knochenmark stammen und eine provaskulogene Population der EPC repräsentieren [Asahara 2011; Bailey 2001; Grant 2002; Pelosi 2002], muss der Ursprung und die Rolle der nicht-hämatopoietischen EPC weitestgehend geklärt werden. Unter Anbetracht der im Rahmen embryologischer und hämatologischer Experimente erhobenen Daten, wird angenommen, dass hämatopoietische Stammzellen und die EPC von einer gemeinsamen Vorläuferzelle abstammen [Asahara 2011; Pelosi 2002; Risau 1988]. In der Entwicklung der Charakterisierung und Identifizierung der EPC bediente man sich daher Methoden und Marker, die in der Hämatologie verwendet werden. Die EPC und hämatopoietische Stammzellen können mithilfe von Antikörpern gegen unterschiedliche Oberflächenmoleküle der Zellen wie Membranrezeptoren CD34, CD133, CXCR4, CD105 (Endothelin) bei menschlichem Probematerial und c-Kit, Sca-1 bei murinem Probematerial in Kombination mit Flk-1/VEGFR-2/KDR mit einer FACS-Analyse identifiziert werden [Timmermanns 2009]. Die Isolation mononukleärer Zellen, Adhäsion auf Fibronectin, DiLDL-Phagozytose und die Anfärbbarkeit mit Lectin stellen weitere Methoden zur EPC-Charakterisierung dar [Lenk 2011]. Darüber hinaus sind zirkulierende und im Knochenmark ortsständige EPC in der Lage koloniebildende Einheiten zu formen, was sie von abgeschilferten zirkulierenden Epithelzellen im Blut unterscheidet [Rehmann 2003].

Freisetzung der EPC

Der Anteil der im Blut zirkulierenden EPC an der Gesamtzahl der mononukleären Zellen ist bei einem gesunden Erwachsenen sehr gering. Er beträgt weniger als 0,1% [Rehmann 2003]. Während die exakten Mechanismen der Freisetzung der EPC aus dem Knochenmark noch nicht vollständig geklärt sind, sind verschiedene endogene und exogene Faktoren bekannt, die die Mobilisation der EPC ins periphere Blut erhöhen. So hat die Gewebeischämie einen besonderen Einfluss auf die Mobilisation der EPC [Park 2004; Shintani 2001; Takahashi 1999]. Nach einem Myokardinfarkt wird die EPC-Mobilisation über Mediatoren wie Stickstoffmonoxid und den *vascular endothelial growth factor* induziert [Shintani 2001]. Darüber hinaus fördern folgende Zytokine und Wachstumsfaktoren die Migration der EPC: G-CSF

[Powell 2005], GM-CSF [Takahashi 1999], Erythropoietin [Heeschen 2003], Angiopoietin [Hattori 2001] und Östrogene [Strehlow 2003]. Auch körperliches Training [Laufs 2004] und eine Behandlung mit Statinen [Dimmeler 2001; Llevadot 2001; Vasa 2001] bewirken eine erhöhte Freisetzung der EPC in die Zirkulation.

2.3 Rezeptoren der PPAR-Familie und ihre Agonisten

Bei den Rezeptoren der PPAR (*peroxisome proliferator-activated receptor*)-Familie handelt es sich um nukleäre Rezeptoren, die über einen physiologischen oder synthetisch hergestellten Liganden aktiviert werden und als Transkriptionsfaktoren die Expression einer Vielzahl von Genen regulieren. Es wurden bisher drei PPAR-Isotypen identifiziert: PPAR- α , PPAR- γ und PPAR- δ/β , auf den nicht näher eingegangen wird.

Wirkmechanismus der PPAR-Agonisten

Die einzelnen PPAR-Isotypen teilen sich trotz ihrer spezifischen Eigenschaften einen gemeinsamen Wirkmechanismus. Ein endogener oder synthetischer Ligand diffundiert durch die Zellmembran und bindet an den *peroxisome proliferator-activated receptor* (PPAR). Dieser Ligand-Rezeptor-Komplex wird in den Zellkern transloziert und bildet ein Heterodimer mit dem Retinsäurerezeptor (RXR). Nach dieser obligaten Heterodimerisierung kommt es zu einer Interaktion mit dem PPAR-*response-element* (PPRE), das in der Promotorregion der PPAR-Zielgene lokalisiert ist. Die Bindung des PPAR-RXR-Heterodimers an das PPRE führt schließlich zu einer Amplifikation bzw. Modulation der Transkription dieser Zielgene [Brown 2007] (**Abbildung 4**).

PPAR- α : ein zentraler Regulator des Fettsäurestoffwechsels

Der PPAR- α spielt eine zentrale Rolle in der Regulation der β -Oxidation der Fettsäuren, die eine wichtige Energiequelle der Zelle darstellen. Dementsprechend werden die PPAR- α vorwiegend in metabolisch aktiven und viel Energie verbrauchenden Gewebe wie Leber, Herz, Skelettmuskel und Nieren exprimiert [Berger 2005; Brown 2007]. Zu den PPAR- α -Zielgenen gehören viele für die

Fettsäureaufnahme, ihren intrazellulären Transport und die β -Oxidation essentiellen Proteine [Brown 2007; Evans 2004]. So bewirkt eine PPAR- α -Aktivierung eine erhöhte Expression der Lipoproteinlipase (LPL), welche auf der Oberfläche der Endothelzellen die Hydrolyse der Triacylglycerine der Lipoproteine katalysiert, und gleichzeitig eine verminderte Expression des Apolipoproteins CIII, das ein endogener Inhibitor der LPL ist [Brown 2007; Frederiksen 2004; Haubenwallner 1995].

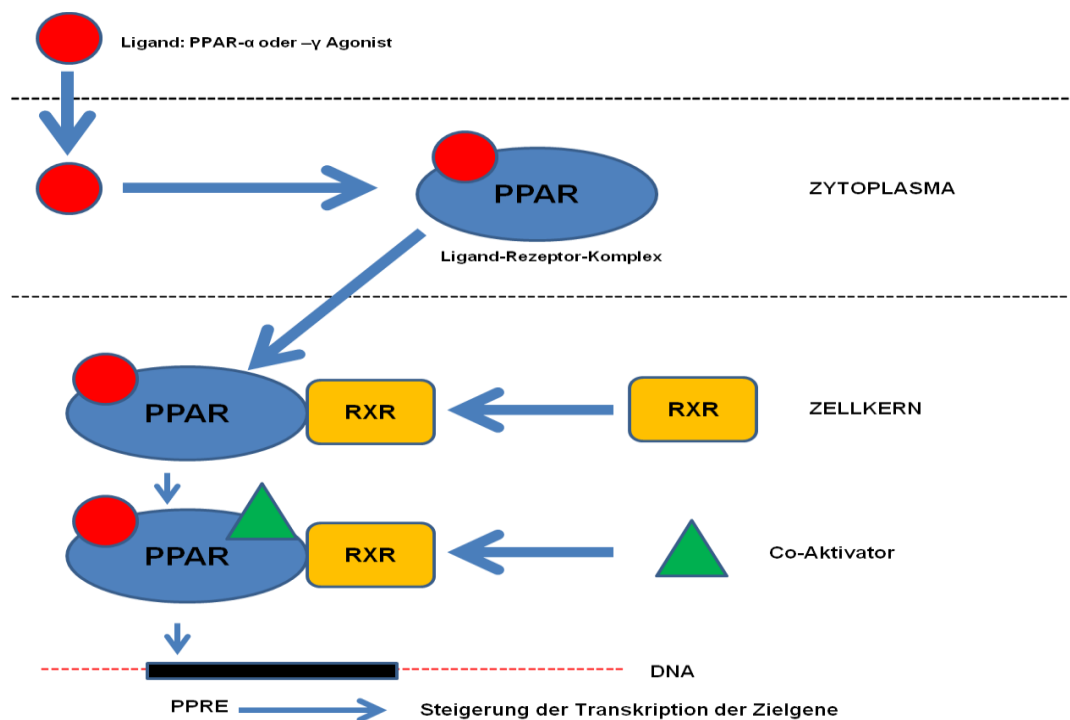


Abbildung 4:

Wirkmechanismus der PPAR-Agonisten [modifiziert nach Brown 2007]

Außerdem erhöht eine PPAR- α -Aktivierung die Transkription der Apolipoproteine AI und AII, die zu den wichtigsten Apolipoproteinen der HDL gehören [Brown 2007; Duez 2005; Schultze 2005]. Angesichts dieser PPAR- α -Effekte werden synthetische PPAR- α -Agonisten wie Fenofibrat und Gemfibrozil in der Therapie einer Dyslipidämie eingesetzt [Friedland 2012; Grundy 2004]. Die Behandlung führt zu einem Anstieg der HDL- [Brown 2007; Friedland 2012; Grundy 2004] und einer Senkung der Triglyceridkonzentration [Brown 2007; Frederiksen 2004; Friedland 2012]. Jedoch ist

die Therapie mit Fibraten mit einer erhöhten Inzidenz von Rhabdomyolyse assoziiert [Friedland 2012, Xavier 2005].

Durch den Nachweis von PPAR- α im Endothel wurde die Möglichkeit in Erwägung gezogen, dass PPAR- α -Agonisten, egal ob natürlichen oder synthetischen Ursprungs, direkte Effekte am Endothel modulieren könnten [Brown 2007; Inoue 1998; Marx 2001]. Darüber hinaus könnte eine Aktivierung der PPAR- α inflammatorische Antworten des Endothels wie z.B. die Expression des *vascular cell adhesion molecule-1*, einem frühen Schritt der Atherogenese, unterdrücken [Brown 2007; Jackson 1999; Marx 1999; Sethi 2002]. Die Effekte der reinen PPAR- α -Agonisten wie Fenofibrat auf die EPC-Funktion sind jedoch noch nicht ausreichend untersucht worden.

PPAR- γ : Ein zentraler Regulator der Adipogenese und Insulinsensitivität

PPAR- γ spielen eine wichtige Rolle bei der Differenzierung der Adipozyten, im Lipidstoffwechsel und Glukosemetabolismus [Brown 2007]. Sie werden hauptsächlich im Fettgewebe, aber auch in einer 10-100fach geringeren Menge in der Leber, Skelettmuskulatur und Herzmuskelgewebe exprimiert [Fajas 2001]. Zielgene des PPAR- γ sind unter anderem die LPL, Glukose-Transporter-4 (GLUT4), Carnitin-Palmitoyl-Transferase 1 (CPT1), Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK) und Adiponektin [Brown 2007]. Durch eine Aktivierung des membranständigen GLUT4 wird die Glukoseaufnahme in die Zelle um das 3-4fache gesteigert [Klinke 2005]. Das mitochondriale Enzym CPT1 vermittelt den Transport langer Fettsäuren durch die mitochondriale Membran [Diéguez 2009], die PEPCK katalysiert den geschwindigkeitslimitierenden Schritt der Gluko- und Glyceroneogenese [Tontonoz 1995]. Das Hormon Adiponektin ist ein vaskuloprotektives Adipokin, das auch an der Regulation des Energie- und Fettstoffwechsels beteiligt ist. Darüber hinaus entfaltet die PPAR- γ -Aktivierung Effekte auf an der Inflammation beteiligte Zellen, auf die vaskuläre Biologie und die Atherosklerose [Blaschke 2006]. So hemmt die PPAR- γ -Aktivierung die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine, Matrix-Metallproteinkinasen und *Scavenger*-Rezeptoren in Monozyten bzw. Makrophagen [Ricote 1998]. Außerdem wird die Rekrutierung und Adhäsion der Monozyten und T-Lymphozyten durch eine verminderte Expression der Adhäsionsmoleküle und chemotaktischer Faktoren in aktivierten Endothelzellen gehemmt [Jackson 1999; Marx 2002]. Im Tiermodell zeigten sich nach einer PPAR- γ -Aktivierung eine

verminderte Proliferation und Migration der glatten Gefäßmuskelzellen sowie Expression des Angiotensin II-Rezeptors [Takeda 2000] und eine geringere Bildung atherosklerotischer Plaques [Li AC 2000].

Angesichts der biologischen Effekte des PPAR- γ werden bzw. wurden die synthetischen PPAR- γ -Agonisten Pioglitazon und Rosiglitazon, die zu der Substanzklasse der Thiazolidindione gehören, in der Therapie von Patienten mit einem Diabetes mellitus Typ 2 eingesetzt. Sie erhöhen die Insulinsensitivität durch eine Steigerung der Adipogenese, reduzieren die Spiegel der freien Fettsäuren, erhöhen den HDL-Spiegel und machen eine aufgrund einer Lipotoxizität entstandene Insulinresistenz wieder rückgängig [Friedland 2012; Oyekan 2011]. Außerdem haben Studienergebnisse die Annahme, dass Thiazolidindione direkte positive vaskuläre Effekte entfalten, gestützt. So wurden bei Patienten unter einer Therapie mit Thiazolidindionen eine verbesserte Reaktionsfähigkeit des Endothels [Campia 2006] und verminderte Spiegel inflammatorischer Marker und Mediatoren [Haffner 2002], sogar bei Patienten, die nicht unter einem Diabetes mellitus litten [Meisner 2006], beobachtet. Pioglitazon erhöhte die EPC-Anzahl und verbesserte die EPC-Funktion in experimentellen Modellen [Gensch 2007; Pistrosch 2005; Sorrentino 2007; Werner C 2011] und bei Patienten mit einer koronaren Herzkrankheit [Werner C 2007].

Da unter der Behandlung mit Rosiglitazon eine Risikoerhöhung einen Myokardinfarkt zu erleiden beobachtet wurde, wurde es in Europa vom Markt genommen [Friedland 2012]. Für Pioglitazon wird ein geringfügig erhöhtes Risiko für das Auftreten eines Blasenkarzinoms und/oder Herzinsuffizienz beschrieben [BfArM 2012].

Der duale PPAR- α/γ -Agonist Aleglitazar

Die simultane Aktivierung der PPAR- α und PPAR- γ könnte ermöglichen, die positiven metabolischen Effekte beider Rezeptoren miteinander zu kombinieren. Mit diesem Ziel wurde der neue duale PPAR- α/γ -Agonist Aleglitazar entwickelt [Bénardeau 2009; Cavender 2010; Charbonnel 2009; Henry 2009; Herz 2011; Sanwald-Ducray 2010]. *In-vitro* Experimente haben gezeigt, dass Aleglitazar ein potenter und hochaffiner Ligand sowohl der PPAR- α als auch der PPAR- γ ist [Bénardeau 2009; Dietz 2012; Hansen 2011]. Aufgrund der balancierten Affinität zu beiden Rezeptoren ist Aleglitazar ein dualer PPAR- α/γ -Agonist mit den therapeutisch gewünschten Eigenschaften und einem verbesserten Sicherheitsprofil [Hansen 2011; Pourcet 2006] im Vergleich zu zuvor entwickelten dualen PPAR- α/γ -Agonisten

[Bakumar 2007; Hansen 2011; Nissen 2005]. Mitte 2009 hat die F.Hoffmann-La Roche AG beschlossen mit Aloglitazar eine Phase-III-Studie (ALECARDIO) aufzunehmen. In der SYNCHRONY-Studie, einer randomisierten doppelt-verblindeten klinischen Studie der Phase II, die an Patienten mit einem Diabetes mellitus Typ 2 durchgeführt wurde, führte die Behandlung mit Aloglitazar zu einer effektiven Blutzuckerkontrolle, einer Verbesserung der Lipidwerte, einer Blutdrucksenkung sowie einer Senkung der für das kardiovaskuläre Risiko relevanter inflammatorischer Marker. Darüber hinaus wurde Aloglitazar von den Patienten gut vertragen [Henry 2009]. Aktuell werden mit Aloglitazar verschiedene Phase-III-Studien durchgeführt (z.B. ALECARDIO, AlePrevent, AleNephro). Die Ergebnisse dieser Studien sind notwendig, um die klinische Wirksamkeit der Substanz zu beurteilen.

2.4 Fragestellung der Arbeit

Was die molekularen Wirkmechanismen und vaskulären Effekte des dualen PPAR- α/γ -Agonisten Aloglitazar angeht, ist nur wenig bekannt. Unsere Arbeitsgruppe untersuchte daher *in-vivo* in einem Tiermodell die Auswirkungen einer Aloglitazarbehandlung auf EPC, endotheliale Funktion, Neoangiogenese und Atherosklerose. Ergänzend wurden *in-vitro* Experimente mit humanen EPC durchgeführt. Dabei sollten im Einzelnen folgende Fragen beantwortet werden:

1. Führt eine *in-vivo* Behandlung bzw. *in-vitro* Stimulation mit Aloglitazar zu einer vermehrten Mobilisierung der EPC aus dem Knochenmark?
2. Führt eine *in-vivo* Behandlung bzw. *in-vitro* Stimulation mit Aloglitazar zu einer Steigerung der Funktionsfähigkeit der EPC?
3. Welche Signaltransduktionswege sind an der Wirkung des Aloglitazar auf EPC beteiligt? Welche Effekte werden über PPAR- α und welche über PPAR- γ vermittelt?
4. Führt Aloglitazar zu einer Steigerung der Neoangiogenese, dem funktionellen Korrelat einer verbesserten EPC-Funktion?

5. Verbessert Aleglitazar die endotheliale Funktion und ist es in der Lage einer Atherosklerose vorzubeugen oder das Ausmaß ihrer Ausbildung zu begrenzen?

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Produkt	Firma, Sitz
1kb Plus DNA Ladder	Invitrogen, D-76131 Karlsruhe
1,19-dioctadecyl-3,3,39,39-tetramethylindo-carbocyanine markiertes acetyliertes low-density lipoprotein (Di-ac-LDL)	Cell Systems, D-53562 St.Katharinen
2-Mercaptophenol	Sigma-Aldrich, D-82024 Taufkirchen
Acrylamid 30%	Bio-Rad Laboratories, D-80939 München
α -D(+)-Glukose	Sigma-Aldrich, D-82024 Taufkirchen
Aleglitazar	F. Hoffmann- La Roche, Basel, Schweiz
Ammoniumpersulfat (APS 10%)	Sigma-Aldrich, D-82024 Taufkirchen
Amphotericin B	Lonza Cologne GmbH, D-50829 Köln
Aprotinin (from bovine lung)	Sigma-Aldrich, D-82024 Taufkirchen
Aqua ad iniectabilia	Braun, D-34212 Meisungen
Aqua dest	Braun, D-34212 Meisungen
Biocoll Separating Solution	Biochrom AG, D-12247 Berlin
Bovines Serumalbumin (BSA)	SERVA Electrophoresis GmbH, D-69115 Heidelberg
Bovine Brain Extract	Lonza Cologne GmbH, D-50829 Köln
Bromphenolblau	Merck, D-64293 Darmstadt
CaCl_2	Merck, D-64293 Darmstadt
Carbachol	Sigma-Aldrich, D-82024 Taufkirchen
Cell Wash	BD Pharmigen, D-69126 Heidelberg
Chloroform	Merck, D-64293 Darmstadt
Clonetics® Endothelial Cell Basal Medium	Lonza Cologne GmbH, D-50829 Köln

D _c Protein-Assay Reagent A	Bio-Rad Laboratories, D-80939 München
D _c Protein-Assay Reagent B	Bio-Rad Laboratories, D-80939 München
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, D-89555 Steinheim
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, D-82024 Taufkirchen
Dodecylsulfat Natriumsalz (SDS)	VWR International, D-64295 Darmstadt
ECL	GE Healthcare AmershamLife Science, Buckinghamshire, UK
Einbettmedium für Gefrierschnitte	Leica Microsystems Nussloch GmbH, D- 69226 Nussloch
Essigsäure zur Analyse (Eisessig)	Merck, D-64293 Darmstadt
Ethanol 99%	Merck, D-64293 Darmstadt
Ethidiumbromid	Merck, D-64293 Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, D-82024 Taufkirchen
Extra Thick Blot Paper 15x20cm	Bio-Rad Laboratories, D-80939 München
FACS Clean	BD Pharmigen, D-69126 Heidelberg
FACS Flow	BD Pharmigen, D-69126 Heidelberg
FACS Rinse	BD Pharmigen, D-69126 Heidelberg
F _c -Block	Becton Dickinson Biosciences, New Jersey, USA
Fenofibrat	Sigma-Aldrich, D-82024 Taufkirchen
Fibronectin	Sigma-Aldrich, D-82024 Taufkirchen
FITC-markiertes <i>Ulex europaeus</i> Lectin (10µg/ml)	Sigma-Aldrich, D-82024 Taufkirchen
Fluorescent Mounting Medium	DAKO, D-22769 Hamburg
Fetales Kälberserum (FKS)	Invitrogen, D-76131 Karlsruhe
Formaldehyd	Merck, D-64293 Darmstadt
G 10%	Braun, D-34212 Meisungen
Gentamicin	Lonza Cologne GmbH, D-50829 Köln
Glycerol	Sigma-Aldrich, D-82024 Taufkirchen
Glyceroltrinitrat (Trinitrosan [®])	Merck, D-64293 Darmstadt
Glycin	VWR International, D-64295 Darmstadt
GW9662 (PPAR-γ-Antagonist)	Cayman Chemicals, Ann Arbor, USA
HEK293 Zellen	Gibco Invitrogen, D-76131 Karlsruhe
HEPES	SERVA Electrophoresis GmbH, D-69115

	Heidelberg
High Range Marker	Bio-Rad Laboratories, D-80939 München
Human endothelial growth factor	Lonza Cologne GmbH, D-50829 Köln
Hydrocortison	Lonza Cologne GmbH, D-50829 Köln
Isopropanol	Merck, D-64293 Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, D-64293 Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck, D-64293 Darmstadt
di-Kaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4)	Merck, D-64293 Darmstadt
Kaliumhydroxid (KOH)	Merck, D-64293 Darmstadt
Ketavet® 100mg/ml	Pfizer GmbH, D-10785 Berlin
Leupeptin	Sigma-Aldrich, D-82024 Taufkirchen
LightCycler Fast Start SYBR Green PCR Master Mix	Roche, D-68305 Mannheim
L-NAME-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich, D-82024 Taufkirchen
Low Range Marker	Bio-Rad Laboratories, D-80939 München
Magnesiumchlorid (MgCl_2)	Merck, D-64293 Darmstadt
Methanol	Merck, D-64293 Darmstadt
Mikrospheren 0,2µm	Molecular Probes Invitrogen, D-76131 Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH, D-76185 Karlsruhe
di-Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck, D-64293 Darmstadt
Nitrozellulosemembran	Bio-Rad Laboratories, D-80939 München
Oil Red O (Solvent Red 27)	Clin-Tech Limited, Unit G Perram Works, Guildford, UK
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, D-64293 Darmstadt
peqGOLD dNTP-Mix	Peqlab Biotechnologie GmbH, D-91052 Erlangen
peqGOLD RNAPure	Peqlab Biotechnologie GmbH, D-91052 Erlangen
peqGOLD Universal-Agarose	Peqlab Biotechnologie GmbH, D-91052 Erlangen
Pharmlyse	BD Pharmigen, D-69126 Heidelberg
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, D-82024 Taufkirchen
Phenylephrin	Sigma-Aldrich, D-82024 Taufkirchen

Pioglitazone	Cayman Chemicals, Ann Arbor, USA
Pioglitazon	Takeda Pharma GmbH, D-52066 Aachen
Platinum SYBR Green qPCR	Invitrogen, D-76131 Karlsruhe
Propidiumiodid (50µg/ml)	Sigma-Aldrich, D-82024 Taufkirchen
Rimadyl® (Carprofen)	Pfizer GmbH, D-10785 Berlin
RNAasin (RNase Inhibitor)	Promega, Madison, USA
RNase freies Wasser	Peqlab Biotechnologie GmbH, D-91052 Erlangen
Rompun® 2% (Xylazin)	Pfizer GmbH, D-10785 Berlin
Softasept N Hautdesinfektionsmittel	Braun, D-34212 Meisungen
Stromal-Derived Factor 1 (SDF-1) 10µg	R&D Systems, D-65205 Wiesbaden
Taq-Polymerase	Peqlab Biotechnologie GmbH, D-91052 Erlangen
Temed (N,N,N',N'-	Sigma-Aldrich, D-82024 Taufkirchen
Tetramethylethylendiamin)	
TRAPeze 1x CHAPS Lysis Buffer	Chemicon International
Tris-hydroxy-methyl-aminomethan	Sigma-Aldrich, D-82024 Taufkirchen
Trockenmilchpulver	TSI GmbH, D-27392 Zeven
Trypsin	Promocell, D-69126 Heidelberg
Türkslösung	Merck, D-64293 Darmstadt
Tween20	Sigma-Aldrich, D-82024 Taufkirchen
Vectashield® Mounting medium for fluorescence with DAPI H-1200	Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA-94010, USA
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) 30%	Sigma-Aldrich, D-82024 Taufkirchen
Xylen Cyanol F	Sigma-Aldrich, D-82024 Taufkirchen

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Firma, Sitz
BD Falcon Tubes	BD Pharmigen, D-69126 Heidelberg
Boyden Kammer HTS Fluoroblock 8µm	Becton Dickinson Biosciences, New Jersey, USA
Butterflykanüle	Sarstedt KG&Co., D-51582 Nümbrecht
Cell Scraper (Zellschaber) 25 cm	Sarstedt Inc., Newton, USA
Cell Strainer (Zellsieb) 70 µm Nylon	BD Falcon TM , Erembodegem, Belgien
Cutfix Einmal-Skalpell	Braun, D-34212 Meisungen
Eppendorfgefäße	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, D-50389 Wesseling-Berzdorf
Glaskapillaren	Roche, D-68305 Mannheim
Glass Plates 1,5mm	Bio-Rad Laboratories, D-80939 München
Kanülen BD Microlance	Becton Dickinson S.A., Fraga, Spanien
Kanülen Unolok	HMD Healthcare Ltd., Hereford, UK
Küvetten Acryl 10x4x45mm	Sarstedt KG&Co., D-51582 Nümbrecht
MULTIWELL [®] 24 Well	Becton Dickinson, Le Pont de Claix, Frankreich
Neubauer Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH&Co.KG, D-97922 Lauda-Königshofen
Nitril Handschuhe	Rösner-Mautby Meditrade GmbH, D-83088 Kiefersfelden
Nunc Lab Tec Chamber Slide	Nalge Nunc International, Rochester, NY-14625, New York, USA
Objektträger (Microscope slides)	VWR International, D-64295 Darmstadt
Outer Glass Plate PLT 1,5mm	Bio-Rad Laboratories, D-80939 München
Pipettenspitzen	Sarstedt KG&Co., D-51582 Nümbrecht
Polypropylene Conical Tube 50 ml	BD Falcon TM , Erembodegem, Belgien
Polyvinylschwamm	ITW Rippey, El Dorado Hills, CA-95762, USA
Serological Pipet	Falcon [®] , Le Pont de Claix, Frankreich
S-Monovette [®] 10ml 9NC	Sarstedt KG&Co., D-51582 Nümbrecht

Spritzen	Braun, D-34212 Meisungen
Stericup	Millipore Corporation, Massachusetts, USA
Zellkulturplatte 6	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz

3.1.3 Antikörper und Primer

Produkt	Firma, Sitz
---------	-------------

FACS

Anti-IgG _κ -fluorescein isothiocyanate (-FITC)	BD Pharmigen, D-69126 Heidelberg
Anti-IgG _κ -Phycoerythrin (-PE)	BD Pharmigen, D-69126 Heidelberg
Anti-VEGFR-2 (-KDR) (-PE) (Flk-1) Avas12α1	R&D Systems, D-65205 Wiesbaden
Anti-Annexin V-FITC	BD Pharmigen, D-69126 Heidelberg
Anti-Sca-1-fluorescein isothiocyanate (Sca-1-FITC; E13-161.7)	BD Pharmigen, D-69126 Heidelberg

Western Blot

Primärantikörper

Mouse monoclonal IgG anti-glyceralaldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; 6C5: sc-32233)	Santa Cruz Biotechnology Inc., CA-95060, Santa Cruz, USA
Rabbit polyclonal IgG anti-eNOS	Acris Antibodies GmbH, D-32052 Herford
Mouse monoclonal IgG anti-p-eNOS (S1177; BD1250)	Acris Antibodies GmbH, D-32052 Herford
Rabbit polyclonal IgG anti-total Akt	Cell Signaling Technology Inc., MA-01923, Danvers, USA
Rabbit polyclonal IgG anti-p-Akt (Ser473)	Cell Signaling Technology Inc., MA-

	01923, Danvers, USA
Rabbit polyclonal IgG anti-p53 (FL-393: sc-6234)	Santa Cruz Biotechnology Inc., CA-95060, Santa Cruz, USA
Rabbit polyclonal IgG anti-Bcl-2 (sc-492)	Santa Cruz Biotechnology Inc., CA-95060, Santa Cruz, USA

Sekundärantikörper

Anti-Rabbit IgG Peroxidase	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	D-82024
Anti-Mouse IgG Peroxidase	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	D-82024

PCR-Primer

PPAR- α <i>fw</i> -5'-TGAACAAAGACGGGATG-3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg	D-85560
PPAR- α <i>rev</i> -5'TCAAACCTTGGGTTCCATGAT-3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg	D-85560
PPAR- γ <i>fw</i> -5'-CATGCTTGTGAAGGATGCAAG-3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg	D-85560
PPAR- γ <i>rev</i> -5'-TTCTGAAACCGACAGTACTGACAT-3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg	D-85560
ACX-Primer: GCGCGGCTTACCCTTACCCTTACCCTAACC	Eurofins MWG Operon, Ebersberg	D-85560
TS-Primer: AATCCGTCGAGCAGAGTT	Eurofins MWG Operon, Ebersberg	D-85560
ACO (BC054727.1) <i>fw</i> -5'-TGTTTAAGAAGAGTGCCACCAT-3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg	D-85560
ACO (BC054727.1) <i>rev</i> -5'-ATAAGTGCCCGTGATCTCCA-3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg	D-85560
FABP3 (BC089542.1) <i>fw</i> -5'-CCCCTCAGCTCAGCACCAT-3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg	D-85560

FABP3 (BC089542.1)	<i>rev-5'</i> -	Eurofins MWG Operon, D-85560 Ebersberg
CAGAAAAATCCCAACCCAAGAAT-3'		
CPT1 (NM013495.2)	<i>fw-5'</i> -	Eurofins MWG Operon, D-85560 Ebersberg
AACCCAGTGCCTTAACGATG-3'		
CPT1 (NM013495.2)	<i>rev-5'</i> -	Eurofins MWG Operon, D-85560 Ebersberg
GAACTGGTGGCCAATGAGAT-3'		

3.1.4 Molekularbiologische Kits

Produkt

Firma, Sitz

High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems Deutschland GmbH, D-64293 Darmstadt
Omniscript RT-Kit	Qiagen GmbH, D-40724 Hilden
PCR-kit peqGOLD	Peqlab Biotechnologie GmbH, D-91052 Erlangen
Quantikine [®] Mouse Adiponectin/Acrp Enzyme-linked immunosorbant assay Kit	R&D Systems, Minneapolis, MN-55413, USA

3.1.5 Geräte und Zubehör

Produkt

Firma, Sitz

Autoklav Tuttnauer Systec 3050 EL	Biomedis Laborservice GmbH, D-35394 Giessen
BIOFUGE pico	Heraeus Holding GmbH, D-63450 Hanau
Blutzuckergerät Accu-Chek [®]	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, D-68305 Mannheim
BP-2000 (Blutdruckmessgerät)	Visitech Systems, Apex, NC-27502, USA
Entwicklerautomat (Western Blot) AGFA Curix 600	AGFA, 2630 Mortsels, Belgien

Eppendorf Thermomixer Comfort, Boekel Industries Modell 110001	Boekel Scientific, Feasterville, PA-19053, USA
FACSCalibur	BD Becton Dickinson GmbH, D-69126 Heidelberg
Fluoreszenzmikroskop Nikon Eclipse E600	Nikon GmbH, D-40472 Düsseldorf
Gene Genius Bio Imaging System (Geldokumentationssystem)	Syngene (Europe), Cambridge, UK
Kryostat Leica CM 1900-1-1	Leica Microsystems Nussloch GmbH, D-69226 Nussloch
Kühlzentrifuge Heraeus Megafuge 1.0R	Heraeus Holding GmbH, D-63450 Hanau
LightCycler System	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, D-68305 Mannheim
Magnetrührer IKAMAG [®] RCT	IKA [®] -Werke GmbH&Co.KG, D-79219 Staufen
Microplate Reader Model 550	Bio-Rad Laboratories, D-80939 München
Mikroskop Olympus CK 2	Olympus, Deutschland
NanoDrop ND-2000 Spectrophotometer	Peqlab Biotechnologie GmbH, D-91052 Erlangen
One Touch Teststreifen Accu-Chek Sensor	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, D-68305 Mannheim
pH-Meter 526	WTW GmbH, D-82362 Weilheim
Pipetten Eppendorf Research	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, D-50389 Wesseling-Berzdorf
Pipetus [®]	Hirschmann Laborgeräte GmbH&Co.KG, D-74246 Eberstadt
Powerpack 200 Power Supply	Bio-Rad Laboratories, D-80939 München
Schüttler Polymax 1040	Heidolph Instruments GmbH&Co.KG, D-91126 Schwabach
StepOne Plus Real-Time PCR System	Applied Biosystems Deutschland GmbH, D-64293 Darmstadt
Sterilbank HERAsafe	Heraeus Holding GmbH, D-63450 Hanau
Thermocycler Px2	Thermo Electron Corporation, Ohio 45750, Marietta, USA

Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories, D-80939 München
Tissue Organ Bath System	Danish Myo Technology A/S, 8200 Aarhus N, Dänemark
UV/Vis Spectrophotometer DU [®] 730	Beckmann Coulter GmbH, D-47807 Krefeld
Überkopfschüttler REAX 2	Heidolph Instruments GmbH&Co.KG, D-91126 Schwabach
Vortexer VV3	VWR International, D-64295 Darmstadt
Waage Acculab	Sartorius AG, D-37075 Göttingen
Wasserbad GFL 1086	Memmert GmbH&Co.KG, D-91126 Schwabach
Zellinkubator HERAcell 150	Heraeus Holding GmbH, D-63450 Hanau

3.1.6 Software

Programm (Version)

Firma, Sitz

CellQuest Pro (Version 6.0)	Becton Dickinson, D-69216 Heidelberg
Data Acquisition Systems for Tissue Organ Bath System-750T0BS	Danish Myo Technology A/S, 8200 Aarhus N, Dänemark
GraphPad Prism (V 5.0)	GraphPad Software Inc., La Jolla, CA-92037, USA
IBM [®] SPSS Statistics Software (V19.0)	IBM Deutschland GmbH, D-71139 Ehningen
Labworks (V4.6)	UVP Inc., Upland, CA-91786, USA
LightCycler Software (V3.0)	Roche, D-68305 Mannheim
Microsoft Office Paket 2003, 2007, 2010	Microsoft Deutschland GmbH, D-85716 Unterschleißheim
NIS 3.0 BR	Nikon GmbH, D-40472 Düsseldorf
StepOne Software (V2.0)	Applied Biosystems Deutschland GmbH, D-64293 Darmstadt
Syngene Gene Snap (7.12)	Syngene (Europe), Cambridge, UK

XnView (V 1.98.5)	Pierre-Emmanuel Gougelet, F-51100, Reims
-------------------	---

3.1.7 Puffer und Lösungen

Allgemein verwendete Puffer und Lösungen

10x Phosphate-buffered Saline (10xPBS)

NaCl	80g
Na ₂ HPO ₄	14,4g
KCl	2g
KH ₂ PO ₄	2,4g

(ad 1000ml mit *Aqua dest*, pH 7,4)

10x Phosphate-buffered Saline-Tween 1% (10xPBS-Tween 1%)

NaCl	80g
Na ₂ HPO ₄	14,4g
KCl	2g
KH ₂ PO ₄	2,4g
Tween 20	10ml

(ad 1000ml mit *Aqua dest*, pH 7,4)

1mM EDTA-Lösung

EDTA	372,24g
------	---------

(ad 100ml mit *Aqua dest*, pH 8,0)

Speziell verwendete Puffer und Lösungen

Milz-EDTA-Puffer

10xPBS	100ml
FKS	10ml
EDTA (0,5M)	40µl
(ad 1000ml mit <i>Aqua dest</i> , Sterilfiltration)	

FACS-Puffer-BSA

1xPBS	500ml
FKS	25ml
BSA	2,5g

10x Binding Buffer

HEPES	24,9g
NaCl	81,2g
CaCl ₂	2,75g
(ad 1000ml mit <i>Aqua dest</i> , pH 7,4)	

Tyrode

NaCl	34,56g
CaCl ₂	1,837g
KCl	1,763g
MgCl ₂	0,571g
KH ₂ PO ₄	0,816g
NaHCO ₃	10,5g
EDTA	0,048g
D-(+)-Glukose	4,955g
(ad 5000ml mit <i>Aqua dest</i> , pH 7,4)	

Ölrot-Farblösung

Stammlösung

Ölrot (Solvent Red 27) 500mg

99% Isopropanol 100ml

(etwa 3h Rühren)

pro 100ml Stammlösung vor Gebrauch:

Aqua dest 66,7ml

(24h Rühren, kurz aufkochen und abkühlen lassen, vor Gebrauch filtrieren)

Proteinlysepuffer

Tris (1M, pH 6,8) 5ml

10% SDS 20ml

Glycerol 10ml

Aqua dest 15ml

pro ml Proteinlysepuffer vor Gebrauch:

PMSF 0,1M 1µl (0,1mM)

Leupeptin 1µg/µl 1µl (1µg/ml)

Aprotin 1,1mg/ml 0,9µl (1µg/ml)

5x Ladepuffer

50% Glycerol 5ml

Tris (0,625M, pH7,6) 2,5ml

SDS 1,25g

Ampuwa 0,75ml

etwas Bromphenolblau zum Anfärben

pro 875µl 5xLadepuffer vor Gebrauch:

DTT (1M) 125µl

10xElektrophoresepuffer

Glycin	720g
Tris	151,5g
SDS	50g

(ad 5000ml mit *Aqua dest*)

Transferpuffer

Tris	2,9g
Glycin	14,5g
Methanol	200ml

(ad 1000ml mit *Aqua dest*, pH 8,3)

Trenngel (für 2 Gele)

	10% Gel	12% Gel
<i>Aqua dest</i>	7,9ml	6,6ml
30% Acrylamidmix	6,7ml	8,0ml
Tris (1,5M, pH 8,8)	5,0ml	5,0ml
10% SDS	0,2ml	0,2ml
10% Ammoniumpersulfat	0,2ml	0,2ml
TEMED	0,008ml	0,008ml

Sammelgel (für 2 Gele)

<i>Aqua dest</i>	3,4ml
30% Acrylamidmix	0,83ml
Tris (1,0M, pH 6,8)	0,63ml
10% SDS	0,05ml
10% Ammoniumpersulfat	0,05ml
TEMED	0,005ml

50x Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer

NaCl	484g	(4,14M/l)
EDTA	37,2g	(64mM/l)
Eisessig	116ml	(10mM/l)

(ad 2000ml mit *Aqua dest*, pH 8,4)

DNA-Gel

Universalagarose	1,2g
1xTAE Puffer	100ml
Ethidiumbromid	4µl

DNA-Ladepuffer

Glycerol	3ml
<i>Aqua dest</i>	7ml
Xylen Cyanol F	0,5g

3.2 Methoden

3.2.1 Versuchstiere

3.2.1.1 Versuchstiere, Behandlungsgruppen und ihre Besonderheiten

Die Durchführung der Tierexperimente erfolgte in Übereinstimmung mit den institutionellen Richtlinien und dem Deutschen Tierschutzgesetz nach Genehmigung durch die Tierschutzbehörde (Tierversuchsgenehmigung 55/2010). Die Tiere wurden artgerecht bis zu zehn Tieren bei einer Raumtemperatur von 22°C pro Käfig gehalten. Es wurde auf einen zirkadianen Tag-Nacht-Rhythmus von je 12 Stunden hell und dunkel geachtet. Der freie Zugang zu Wasser und Trockenfutter war stets gewährleistet. In einem Käfig befanden sich in etwa gleicher Anzahl Mäuse sowohl der Behandlungsgruppe als auch der Kontrollgruppe. Für unsere Experimente wurden 12 Wochen alte C57Bl/6-Wildtyp-Mäuse (Charles River Laboratories, D-97633, Sulzfeld) und 10 Wochen alte Apolipoprotein E-Knockout (ApoE^{-/-})-Mäuse (C57Bl/6 als genetischer Hintergrund aus Eigenzucht) eingesetzt.

Die verwendete Substanz Aleglitazar ((2S)-2-methoxy-3-[4-[2-(5-methyl-2-phenyl-4-oxazolyl)ethoxyl-7-benzothiophenyl]propansäure) wurde von der F. Hoffmann-La Roche AG (Basel, Schweiz) zur Verfügung gestellt.

C57Bl/6-WT-Mäuse wurden 21 Tage, ApoE^{-/-}-Mäuse 6 bzw. 8 Wochen mit 10mg/kg Körpergewicht (KG) Aleglitazar oder Kontrolllösung (5% DMSO in NaCl 0,9%) mittels täglicher intraperitonealer Injektion behandelt. Als Positivkontrolle wurden pro Mausstamm 3 Versuchstieren 20mg/kg KG Pioglitazon (Takeda Pharma GmbH) injiziert.

C57Bl/6-WT-Tiere wurden mit einem regulären Futter für Mäuse gefüttert. ApoE^{-/-}-Mäuse wurden auf eine fett- und cholesterinreiche atherogene Diät, die sogenannte *Western Type*-Diät, bestehend aus 21% Fett, 19,5% Kasein und 1,25% Cholesterin (Ssniff Spezialdiäten GmbH, D-59494, Soest), gesetzt.

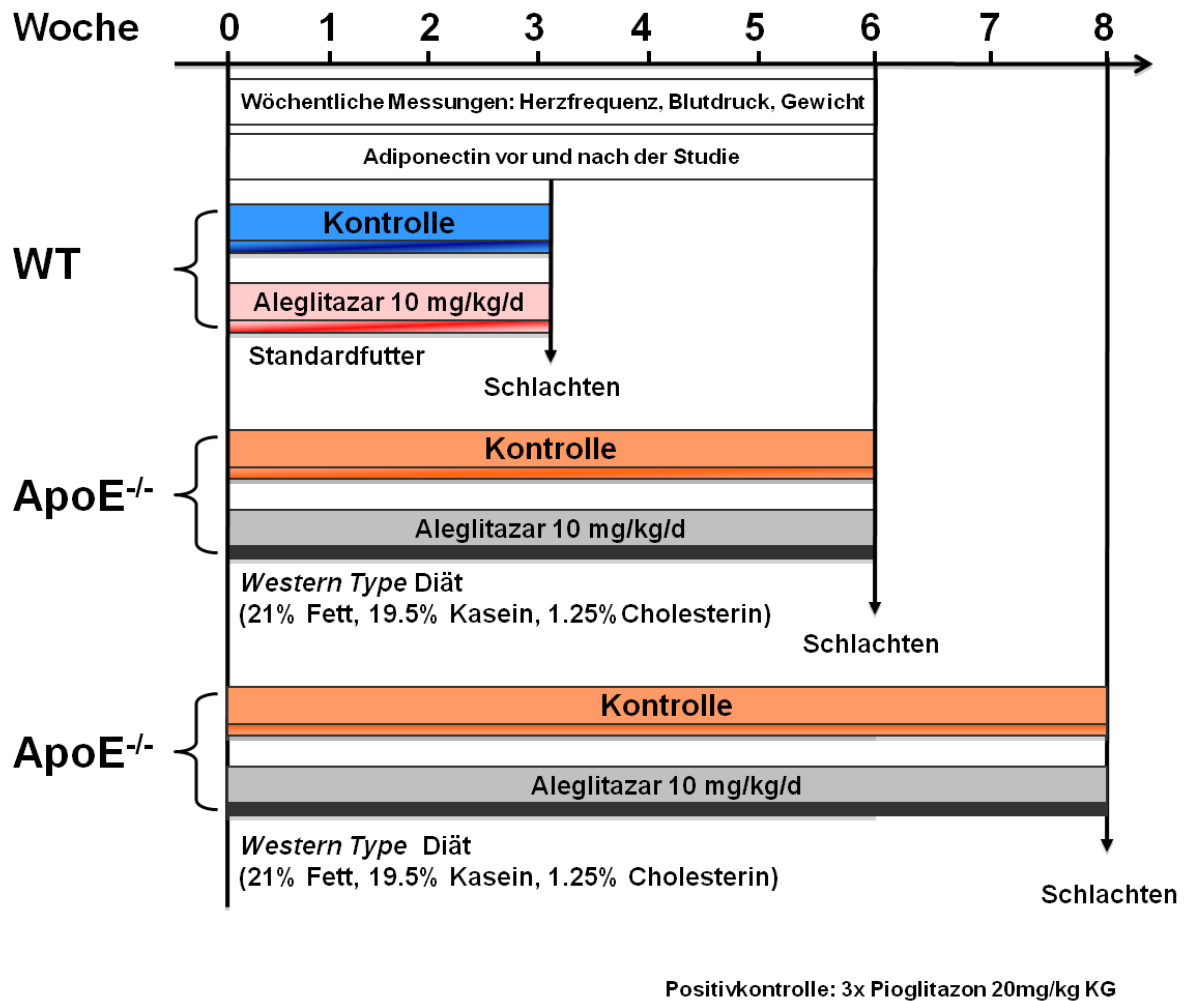


Abbildung 5: Design der Tierstudien

3.2.1.2 Ermittlungen der Vitalparameter

Blutdruck, Herzfrequenz und Gewicht wurden in einem wöchentlichen Intervall ermittelt. Die Messung des Blutdrucks und der Herzfrequenz wurde nicht-invasiv an wachen Mäusen auf einer auf 37°C vorgewärmten, computerbasierten Einheit (BP-2000, Visitech Systems) durchgeführt. Hierzu wurde den Tieren an den Schwanz eine aufblasbare Manschette (*Tail-Cuff-System*) angelegt. Zunächst wurden an drei aufeinanderfolgenden Tagen Probemessungen durchgeführt, um die Tiere mit der Situation vertraut zu machen. Bei den repräsentativen Messungen wurden nach 10 Vormessungen (zur Eingewöhnung) 20 aufeinanderfolgende Messungen in einem Abstand von 60 Sekunden durchgeführt. Die Werte der Einzelmessungen wurden

nachfolgend für jedes einzelne Tier gemittelt und die Mittelwerte aller Messungen für den Vergleich der Tiergruppen untereinander verwendet.

3.2.1.3 Blutentnahmen

Ebenfalls wurde den Tieren in einem wöchentlichen Intervall *in-vivo* eine Blutmenge zwischen 60-100µl aus der *Vena facialis* im Unterkieferbereich entnommen. Mit einer 4mm Lanzette wurde 3 bis 4mm dorsokaudal des Haarwirbels am Unterkiefer punktiert und die Blutstropfen in einem Eppendorfgefäß aufgefangen. Die Einstichstelle wurde etwa eine Minute komprimiert, um eine Hämatombildung zu vermeiden. Das entnommene Blut wurde direkt im Anschluss bei 5000rpm 10min zentrifugiert, das Serum abpipettiert, in ein neues Eppendorfgefäß überführt und bei -20°C gelagert.

Das für die FACS-Analysen zur EPC-Quantifizierung verwendete EDTA-Vollblut wurde den Tieren nach der terminalen Narkotisierung aus der *Vena cava inferior* entnommen.

3.2.2 Peritonealer Glukosetoleranztest

Der Glukosetoleranztest wurde an C57Bl/6-WT- und ApoE^{-/-}-Mäusen nach einer achtstündigen Nüchternphase durchgeführt. Nach der Ermittlung der Nüchtern-Blutzuckerkonzentration wurden den Tieren intraperitoneal 1,5mg/kg KG Glukose injiziert. Nach 20, 30, 60, 120 und 150min wurden den Mäusen mit einer Kapillare weitere Blutproben aus der Schwanzvene zur Bestimmung der Blutzuckerkonzentration entnommen. Diese wurde nach der Glukose-Oxidase-Methode mit einem herkömmlichen Blutzuckergerät mit *One Touch* Teststreifen (Accu-Chek Sensor, Roche) bestimmt [Lenski 2011].

3.2.3 Bestimmung der Adiponektinkonzentration (ELISA)

Bei dem *Enzyme-linked immunosorbent Assay* (ELISA) für Adiponektin handelt es sich um einen sog. *Sandwichassay*, bei dem zwei spezifische hochaffine Antikörper

verwendet werden. Der an die Mikrotiterplatte gekoppelte erste Antikörper bindet das Adiponektin aus der Serumprobe, wodurch das Adiponektin immobilisiert wird. An diesem bindet der zweite spezifische anti-Adiponektin-Antikörper, der biotinyliert und mit einem Streptavidin-Peroxidase-Enzymkonjugat gemischt ist. Die anschließende spezifische Substratreaktion führt zu einem Farbumschlag, wobei die Intensität der resultierenden Färbung proportional zu der Adiponektinkonzentration der Serumprobe ist.

Vor Beginn und nach drei Wochen Behandlung mit Aleglitazar 10mg/kg KG bzw. Kontrolllösung wurde C57Bl/6-WT- und ApoE^{-/-}-Mäusen wie beschrieben venöses Blut entnommen. Das Vollblut wurde 10min bei 5000rpm zentrifugiert, das Serum abpipettiert und zur Messung der Adiponektinkonzentration verwendet. Die Messung erfolgte mit dem *Quantikine[®] Mouse Adiponectin/Acrp Enzyme-linked immunosorbent assay Kit* (R&D Systems) entsprechend der Herstelleranleitung. Unter Verwendung des rekombinanten Adiponektins der Maus (10ng/ml bis 0,16ng/ml) wurde eine Standardkurve erzeugt. Die Messung der Extinktion erfolgte an einem *Microplate Reader Model 550* (Bio-Rad) bei einer Wellenlänge von 450nm und 540nm (Wellenlängenkorrektur). Alle Werte wurden als Doppelbestimmungen ermittelt und als prozentuale Veränderung der Konzentration über die Studiendauer im Vergleich zur Kontrollgruppe angegeben.

3.2.4 EPC-Quantifizierung mit der FACS-Analyse

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen, Peptiden und DNA. Als Grundlage dient der FACS-Analyse eine Zellsuspension, deren Zellen einzeln einen fokussierten Laserstrahl passieren. Das durch die korpuskulären Bestandteile der Zelle dabei erzeugte Streu- und Fluoreszenzlicht wird separat detektiert. Dabei werden die in einer Trägerlösung befindlichen Zellen durch einen Laser mit einem Fluoreszenzlicht bestimmter Wellenlänge bestrahlt. Als Maß für die Zellgröße (FSC-*Forward Scatter*) dient das Vorwärtsstreulicht, das durch die Biegung des Lichts hervorgerufen wird. Im Gegensatz dazu wird das Seitwärtsstreulicht (SCD-*Sideward Scatter*) durch die Brechung des Lichts hervorgerufen und dient als Maß der Granularität der Zellen. Neben der Zellgröße und Granularität werden die Zellen zur

genaueren Quantifizierung vor der Messung mit fluoreszierenden Farbstoffen inkubiert, die entweder an Antikörper (spezifische Bindung an Epitope an der Oberfläche oder in der Zelle) gebunden sind oder direkt mit zellulären Bestandteilen reagieren. Die Zellen emittieren bei Bestrahlung mit einem Laserlicht spezifischer Wellenlänge Fluoreszenzimpulse, die von wellenlängenspezifischen Filtern absorbiert und in elektrische Signale umgewandelt werden. Die erhaltenen Ergebnisse werden mit einer Gerätesoftware in einem Punkteschema (*Scattergramm*) grafisch dargestellt. Das *Scattergramm* ermöglicht die Sortierung und Quantifizierung unterschiedlicher Zellpopulationen.

Die EPC sind durch die Expression der Oberflächenmarker wie *Stem cell antigen-1* (Sca-1) und *Endothelial Growth Factor Receptor-2* (VEGFR-2) bzw. *Kinase insert-domain receptor-1* (KDR) charakterisiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese EPC-Subpopulation quantifiziert.

3.2.4.1 FACS-Analyse der murinen EPC aus EDTA-Vollblut und Knochenmark

Den Versuchstieren wurden aus der *Vena cava inferior* zwischen 50-100µl EDTA-Vollblut entnommen und zur Zelllyse mit je 3ml 1 zu 10 mit destilliertem Wasser verdünnter Pharmlyse (BD Biosciences) versetzt, gevortext und 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf folgte eine Zentrifugation mit 1750rpm und das vorsichtige Absaugen des Überstandes. Nach dem Auffüllen mit je 100µl FACS-BSA-Puffer, wurde die Zellsuspension zur Blockung unspezifischer Bindungen von Antikörpern auf den Zelloberflächen mit je 10µl Fc-Block (Becton Dickinson) 10min bei 4°C inkubiert.

Zur Knochenmarkgewinnung entnahm man den Mäusen die *Tibia* und das *Femur* der hinteren Extremität. Das Knochenmark selbst wurde durch Spülen des Knochens mit je 5ml FACS-BSA-Puffer mithilfe einer 1ml-Spritze mit aufgesetzter Kanüle gewonnen und durch einen Filter (100µm Nylon-Mesh *in conical tube*) separiert. Nach vorsichtigem Absaugen des Überstandes wurde die Zellsuspension bei 4°C mit 1000rpm 10min zentrifugiert. Die Zellen wurden in je 1ml 1 zu 10 mit destilliertem Wasser verdünnter Pharmlyse resuspendiert, 5min auf Eis inkubiert und mit je 2ml FACS-BSA-Puffer geblockt. Es wurde ein zweites Mal bei 4°C mit 1000rpm zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet vollständig in 1ml FACS-

BSA-Puffer resuspendiert. Nach der Zellzählung in der Neubauer-Zählkammer wurden 1×10^6 Zellen in 50 μ l Suspension weiterverarbeitet. Analog der Blutproben wurde zum Schutz vor unspezifischen Bindungen mit je 10 μ l Fc-Block 10min bei 4°C inkubiert [Gensch 2007; Pöss 2010; Werner C 2008].

Nach der oben beschriebenen Aufbereitung beider Proben wurden zur Analyse der funktionsfähigen Lymphozytenpopulation die Antikörper *Sca-1-fluorescein-isothiocyanate* (Sca-1-FITC; E13-161.7, BD Pharmigen) und VEGFR-2 PE (Flk-1) (Avas12 α 1, BD Pharmigen) verwendet. Die zu untersuchende Zellpopulation wurde mit je 10 μ l Antikörper markiert. Als Isotypenkontrolle dienten in jedem Experiment die Antikörper FITC *rat* IgG2a und PE *rat* IgG2a (Becton Dickinson), ebenfalls jeweils 10 μ l pro Probe. Beide Antikörperkonjugate wurden eine halbe Stunde bei 4°C inkubiert, zweimal mit FACS-BSA-Puffer gewaschen und mit 1750rpm (Blutproben) bzw. 1000rpm (Knochenmarkproben) 10min zentrifugiert. Als letzter Arbeitsschritt vor der Messung wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen in je 150 μ l 1xPBS resuspendiert. Die Zellsuspension wurde über eine Kapillare in das Durchflusszytometer gesaugt und untersucht. Die Messung wurde am FACSCalibur Durchflusszytometer (Becton Dickinson) durchgeführt und mit der Cell Quest Software Version 6.0 (BD Biosciences) ausgewertet.

3.2.5 Zellkulturexperimente

Die Isolation und Selektion endothelialer Progenitorzellen (EPC) aus der Gesamtpopulation mononukleärer Zellen (MNC) in der Zellkultur erfolgte in mehreren Arbeitsschritten. Die MNC wurden unter Verwendung der Biocoll *Separating Solution* (Biochrom) nach dem Prinzip der Dichtegradienten-Zentrifugation aus dem Milzgewebe der Versuchstiere oder aus peripherem venösem Blut gesunder freiwilliger Probanden gewonnen. Die weitere Differenzierung der EPC beruhte auf ihrer Fähigkeit zur Adhäsion auf Fibronectin und dem Wachstum in einem endothelspezifischen Kulturmedium (*Endothelial Basal Medium*, EBM).

3.2.5.1 Kulturbedingungen

Die aus der Milz der Versuchstiere bzw. aus dem venösen Blut gesunder Probanden gewonnenen mononukleären Zellen wurden in EBM (Lonza) mit Zusatzstoffen (1µg/ml Hydrocortison, 3µg/ml *Bovine Brain Extract*, 30µg/ml Gentamicin, 50µg/ml Amphotericin B, 10µg/ml hEGF, 20% fetales Kälberserum) in einer 5%igen CO₂-Atmosphäre bei 37°C in Zellkulturschalen unterschiedlicher Größe in Kultur gebracht. Der Mediumwechsel unter einer Zellkulturbank entsprach stets den Anforderungen der Sterilität.

3.2.5.2 Kultur endothelialer Progenitorzellen der Maus

Die Milz übernimmt bei Mäusen die Funktion eines hämatopoietischen Organs. Direkt im Anschluss an die Organentnahme wurde die MNC-Isolation mittels Biocoll-Dichtegradienten-Zentrifugation aufgenommen. Dazu wurde die entnommene Milz in Milz-EDTA-Puffer im Sinne einer physiologischen Lösung, ohne das Organ zu verletzen, mithilfe einer Kanüle von Fettresten befreit und in eine neue Schale mit Milz-EDTA-Puffer gelegt. In dieser wurde vorsichtig die Milzpulpa ausgepresst und die Organhaut verworfen. Durch mehrfaches Aufziehen der Probe mittels einer Spritze mit aufgesetzter Kanüle wurde die Probe homogenisiert, über einen 70µm Zellfilter in einen 50ml Falcon überführt und mit 1xPBS-Lösung auf 35ml aufgefüllt. Mit diesem Milzzellen-EDTA-PBS-Gemisch wurden 15ml Biocoll *Separating Solution*, die in ein zweites 50ml Falcon vorgegeben wurden, vorsichtig überschichtet. Zur Auftrennung der einzelnen Phasen erfolgte eine Zentrifugation (2400rpm, -4°C, 20min) mit langsamem Auslaufen der Zentrifuge. Die chemischen Eigenschaften der Biocoll *Separating Solution* bewirkten die Ausbildung einer Interphase, in der sich die MNC befanden. Diese wurde behutsam abpipettiert, in ein drittes 50ml Falcon überführt und mit 1xPBS auf 50ml aufgefüllt. Es folgte die Pelletierung, die durch eine zweite Zentrifugation (2400rpm, -4°C, 10min), diesmal mit Bremse, erreicht wurde. Der Überstand wurde vorsichtig abgegossen, das Pellet in 500µl EBM mit Zusätzen resuspendiert, die Gesamtzahl der Zellen mithilfe der Neubauer-Zählkammer errechnet und auf die Assays verteilt [Gensch 2007; Pöss 2010; Werner C 2011].

3.2.5.3 Kultur humaner endothelialer Progenitorzellen

Den freiwilligen gesunden Probanden wurde mit einer Butterflykanüle aus der *Vena cubitalis* oder *Vena brachialis* zwischen 40-80ml Citratblut entnommen und direkt im Anschluss weiterverarbeitet. Jeweils 20ml des Citratbluts wurden in ein 50ml Falcon überführt und auf 35ml mit 1xPBS aufgefüllt. Im Anschluss wurden vorsichtig 15ml Biocoll *Separating Solution* mit diesem Blut-PBS-Gemisch überschichtet, mit 2400rpm bei Raumtemperatur (RT) und langsamem Auslaufen der Zentrifuge 20min zentrifugiert. Die ausgebildete Interphase wurde gründlich abpipettiert und zum Waschen der Zellen auf 50ml mit 1xPBS aufgefüllt. Durch erneute Zentrifugation (2400rpm, RT, 10min) mit eingeschalteter Bremse erfolgte die Pelletierung. Der Überstand wurde abgegossen und die Pellets in 10ml 1xPBS resuspendiert. In einem zweiten Waschschrift wurde die Zellsuspension nochmals mit 1xPBS auf 30ml aufgefüllt und zentrifugiert. Die finalen Pellets wurden in EBM mit Zusätzen resuspendiert, ihre Anzahl in der Neubauer-Zählkammer bestimmt und die Zellen auf die Assays verteilt [Werner C 2007; Werner N 2005].

3.2.6 EPC-Quantifizierung mit der DiLDL/Lectin-Färbung

Die EPC wurden durch die Aufnahme von Di-acetyliertem *Low Density Lipoprotein* (Di-ac-LDL) und die Bindung von FITC-markiertem *Ulex europaeus* Lectin identifiziert [Asahara 1997].

In eine 24-Well-Platte wurden NUNC-Deckgläschen eingelegt und mit Fibronectin (10µg/ml) beschichtet. Pro Well wurden 4×10^6 MNC aus der Biocoll-Isolation in einem Gesamtvolumen von 1ml in EBM mit Zusätzen ausgesät und 4 Tage kultiviert. Nach diesem Zeitraum wurde das Medium abgesaugt und die Wells mit 1xPBS gewaschen. Im Anschluss wurden pro Well je 300µl EBM mit Zusätzen und 5µl Di-LDL ([2,4µg/ml], Cell Systems) pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei 37°C wurde der Überstand erneut abgesaugt und die Wells mit 1xPBS gewaschen. Um die Färbung zu fixieren, wurden 300µl 2% Paraformaldehyd pro Well verwendet. Einem weiteren Waschschrift mit 1xPBS folgte die zweite Färbung mit FITC-markiertem Lectin (Sigma-Aldrich). Hierzu wurden pro Well 300µl FITC-Lectin-Verdünnung pipettiert und für drei Stunden bei 37°C inkubiert. Nach zweimaligem

Waschen mit 1xPBS wurden die NUNC-Deckgläschen mit Eindeckmedium (*Mounting Medium*, DAKO) auf Objektträgern eingebettet. Bevor die Objektträger mit einem Deckglas versehen wurden, wurde ein Tropfen DAPI (Vectashield® *Mounting Medium*) zur Zellkernfärbung auf das NUNC-Deckgläschen getropft.

Die mikroskopische Auswertung erfolgte in der 100x Vergrößerung an einem Fluoreszenzmikroskop (Nikon Eclipse E600) mithilfe der NIS 3.0 BR Software, wobei die dreifach positiv gefärbten Zellen (DAPI positiv-blau (kernhaltig), DiLDL positiv-rot, FITC-Lectin positiv-grün) in vier repräsentativen Bereichen pro Deckgläschen als EPC gezählt wurden.

3.2.7 Migrationsassay

Ein wesentlicher Parameter der EPC-Funktion ist ihre migratorische Kapazität, die durch Stimuli wie dem *Stroma Derived Factor-1* (SDF-1) oder *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) ausgelöst werden kann. Sie befähigt die EPC zur Extravasation und Migration in die Gefäßwand [Vasa 2001].

Für den Migrationsassay wurden je 4×10^6 MNC, die durch die Biocoll-Isolation gewonnen wurden, auf mit Fibronectin (10µg/ml) beschichteten 6-Well-Platten in EBM mit Zusätzen 4 Tage lang kultiviert. Nach diesem Zeitraum wurden die EPC mit einem Trypsin/EDTA-Gemisch (1:1, d.h. je 500µl Trypsin und 500µl EDTA [1mM/l; pH 8,0] pro Well) abgelöst und mit 2400rpm bei RT zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 300µl EBM ohne Zusätze resuspendiert. Nach der Zellzählung in der Neubauer-Zählkammer erfolgte die Aussaat von 1×10^5 EPC in einem Gesamtvolumen von 500µl in EBM ohne Zusätze an den Innenrand einer modifizierten Boyden Kammer (HTS Fluoroblock, 8µm Durchmesser, BD Biosciences). Die Boyden Kammer wurde für 24 Stunden in eine 24-Well-Platte mit je 750µl EBM ohne Zusatzstoffe und 7,5µl SDF-1 ([100ng/ml], R&D Systems) gestellt. Nach diesem Zeitraum erfolgte die DiLDL-Färbung wie in Kapitel 3.2.6 beschrieben. Im Anschluss wurden die Filter mit einem Skalpell aus der Kammer geschnitten, mit der Unterseite nach oben auf einen Objektträger aufgebracht und im *Mounting Medium* eingebettet.

Die Quantifizierung der SDF-1-induzierten migratorischen Kapazität erfolgte durch die Auszählung der migrierten EPC an der Filterunterseite. Hierzu wurden die Zellen in vier repräsentativen Bereichen des Filters mit einem Fluoreszenzmikroskop (Nikon Eclipse E600) in der 100x Vergrößerung fotografiert und mithilfe der NIS 3.0 BR Software gezählt. Anschließend wurden die Werte gemittelt.

Bei Experimenten mit humanen EPC erfolgte nach 4 Tagen in Kultur die Stimulation mit Aleglitazar (1nM/l - 100nM/l; alle in DMSO gelöst), Pioglitazon (10µM/l; Cayman Chemicals), GW9962 (1µM/l; Sigma-Aldrich) oder Fenofibrat (150µM/l; Sigma-Aldrich) für einen Zeitraum von 24 Stunden, bevor der eigentliche Migrationsassay gestartet wurde.

3.2.8 Koloniebildende Einheiten (*colony forming units*)

Die Fähigkeit Kolonien zu bilden, ist eine bedeutende Methode die proliferative Kapazität der EPC zu messen. Nach der Biocoll-Isolation aus venösem Blut gesunder Probanden (wie in Kapitel 3.2.5.3 beschrieben), wurden 5×10^6 MNC auf mit Fibronectin (10µg/ml) beschichteten 6-Well-Platten in EBM mit Zusätzen kultiviert. Nach 48h wurden die nicht-adhären Zellen des Überstandes mit einer Pipette aufgenommen, durch Zentrifugation aufgereinigt und gezählt. Anschließend wurden 1×10^6 Zellen auf fibronectinbeschichtete 24-Well-Platten ausgesät und für weitere 5 Tage in EBM mit Zusätzen kultiviert. Die Stimulation mit Aleglitazar (1pM/l-10µM/l; alle in DMSO gelöst), Pioglitazon (10µM/l; Cayman Chemicals), GW9662 (1µM/l; Cayman Chemicals) oder Fenofibrat (150µM/l; Sigma-Aldrich) wurde nach dem Neuaussähen der nicht-adhären Zellen begonnen und dauerte bis zum Auszählen der koloniebildenden Einheiten an [Hill 2003].

Die als Zellcluster von mehr als 15 Zellen definierten Kolonien wurden in einer 200x Vergrößerung unter einem Lichtmikroskop (Olympus CK 2) gezählt. Die ermittelten Werte wurden als absolute Zahl der Kolonien pro Well angegeben.

3.2.9 Bestimmung der Apoptoserate humaner EPC mittels Annexin V/ Propidiumiodid-FACS

Die Messung der EPC-Apoptoserate mittels der FACS-Analyse basiert auf der hohen Affinität des Annexin V zu Membranphosphatidylserinen, die bei einer intakten Zellmembran an der Membraninnenseite lokalisiert sind. Die Rate apoptotischer Zellen kann mittels Annexin V-Färbung durchflusszytometrisch bestimmt werden, da bereits in frühen Phasen der Zellapoptose Phosphatidylserine nach außen transloziert werden. Bei der Zellnekrose kann Annexin V in die Zellen diffundieren und auch an Phosphatidylserin binden, da es zu einem Verlust der Integrität und somit Permeabilität der Zellmembran kommt. Aus diesem Grund ist die Unterscheidung durch die alleinige Färbung mit Annexin V zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen nicht möglich. Erst die Zugabe von Propidiumiodid, einem DNA-Farbstoff, der nur permeabilisierte Zellkernmembranen nekrotischer Zellen passieren kann, ermöglicht diese Unterscheidung. So können lebende Zellen (Annexin V negativ, Propidiumiodid negativ) von apoptotischen Zellen (Annexin V positiv, Propidiumiodid negativ) und nekrotischen Zellen (Annexin V positiv, Propidiumiodid positiv) unterschieden werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 4×10^6 MNC, die mittels Biocoll-Isolation aus venösem Blut gesunder Probanden gewonnen wurden, auf fibronectinbeschichtete 6-Well-Platten in EBM mit Zusätzen ausgesät. Nach 4 Tagen in Kultur wurden die Zellen mit Aleglitazar (10nM/l) allein oder in Kombination mit Wasserstoffperoxid (H_2O_2 , 300 $\mu\text{M/l}$) 24h stimuliert. In diesem Schadensmodell sollte die basale Apoptoserate mit der Apoptoserate unter oxidativem Stress (hier ausgelöst durch H_2O_2) verglichen werden. Nach der Stimulation wurde das EBM abgesaugt und die Zellen mit einem Trypsin/EDTA-Gemisch sanft abgelöst. Die Zellen wurden 5min mit 2000rpm in einer Tischzentrifuge (Heraeus Biofuge pico) zentrifugiert und die Zellpellets in jeweils 100 μl 1x*Binding Buffer* resuspendiert. Nach dem Transfer in die FACS-Röhrchen wurden die Antikörper, je 5 μl FITC-konjugiertes Annexin V (BD Pharmingen) und 5 μl Propidiumiodid (Sigma-Aldrich), hinzugegeben. Nach 15min Inkubation im Dunkeln auf Eis, wurden nochmals je 100 μl 1x*Binding Buffer* hinzupipettiert und die FACS-Ansätze gründlich gevortext [Gensch 2007]. Direkt im Anschluss wurde die Zellsuspension über eine Kapillare in das Durchflusszytometer

gesaugt und untersucht. Die Messung wurde am FACSCalibur Durchflusszytometer (Becton Dickinson) durchgeführt und mit der Cell Quest Software Version 6.0 (BD Biosciences) ausgewertet. Alle Messungen wurden doppelt vorgenommen.

3.2.10 Disc-Neoangiogenese-Modell

Zur Beurteilung des Wachstums und der Funktionalität neu entstandener Kapillargefäße gehört das Disc-Neoangiogenese-Modell zu den etablierten Methoden [Fajardo 1988].

Unter Narkose (Ketavet 0,1ml/10g+Rompun 0,05ml/10g KG, 1 zu 10 verdünnt) wurde den C57Bl/6-WT-Mäusen in Rückenmitte über der Wirbelsäule eine ca. 1-1,5cm große Hautinzision gesetzt. In beide Flanken wurden stumpf und unblutig subkutane Taschen präpariert, jeweils mit 0,5ml steriler NaCl-Lösung gespült und ein Polyvinylschwamm (Rippey), der beidseitig mit einer Nitrozellulosemembran (Biorad) bedeckt war, eingebaut. Aufgrund des so präparierten Polyvinylschwamms konnten die Kapillaren lediglich von der Seite in den Randsaum einsprossen. Als Nachsorge erhielten die Tiere eine Analgesie mit Carprofen. Nach 21 Tagen Behandlung mit Aleglitazar 10mg/kg KG bzw. Kontrolllösung wie beschrieben, wurden in das Kapillarsystem der Mäuse fluoreszierende Mikrosphären (0,2µm; Molecular Probes) perfundiert und die Polyvinylschwämme explantiert. Hierzu wurden nach der terminalen Narkose Thorax und rechter Ventrikel des Herzens der Versuchstiere eröffnet. Um eine Blutfreiheit des Gefäßsystems zu erreichen, wurde durch den linken Ventrikel des Herzens eine 10µmolare EDTA-NaCl-Lösung mithilfe einer Butterflykanüle langsam injiziert. Dem folgte durch die gleiche Butterflykanüle die Perfusion mit 2ml verdünnten Mikrosphären, um somit nur funktionelle neu entstandene Kapillaren darzustellen [Gertz 2012; Laufs 2004]. Die entnommenen perfundierten Polyvinylschwämme wurden feucht bei 4°C in dunkler Umgebung gelagert.

Die quantitative Auswertung der neu eingewachsenen Gefäße erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop (Nikon Eclipse E 600) mithilfe der NIS 3.0 BR Software. Das Ausmaß der Vaskularisation wurde als die vaskularisierte Fläche des Polyvinylschwamms dividiert durch seine Gesamtfläche x 100 berechnet.

3.2.11 Endothelfunktionsprüfung

Um die Funktion des Endothels zu prüfen, wurden isometrische Tonusstudien an Aortenringen der Versuchstiere durchgeführt. Diese Methode basiert auf der Tatsache, dass ein dysfunktionelles Endothel die Fähigkeit verliert, den Gefäßtonus auf endogen oder exogen induzierte Veränderungen angemessen zu regulieren.

Zur Messung der Endothelfunktion wurde C57Bl/6-WT-Mäusen (gefüttert mit regulärem Trockenfutter) und ApoE^{-/-}-Mäusen (gefüttert mit *Western Type*-Diät), die wie beschrieben 6 Wochen mit Aleglitazar oder Kontrolllösung behandelt wurden, Teile der thorakalen *Aorta descendens* entnommen. Die Präparate wurden vom Fett der *Adventitia* befreit und in Tyrodelösung (NaCl 118mM/l, CaCl₂ 2,5mM/l, KCl 4,73mM/l, MgCl₂ 1,2mM/l, KH₂PO₄ 1,2mM/l, NaHCO₃ 25mM/l, NaEDTA 26μM/l, D(+)-Glukose 5,5mM/l; pH 7,4) eingetaucht. Pro Versuchstier wurden vier 3mm lange Aortenringe in mit Tyrodelösung gefüllte Organbadbehälter (37°C, kontinuierliche Begasung mit 95% O₂ und 5% CO₂), die an eine Messanlage angeschlossen waren, eingebracht, und auf durch das Aortenlumen reichende Häkchen, die mit einem Kraftabnehmer (*Transducer*) verbunden waren, gehängt. Die isometrischen Spannungsänderungen der glatten Gefäßmuskulatur konnten über den Kraftabnehmer gemessen und durch digitale Umwandlung auf einem Computerbildschirm grafisch sichtbar gemacht werden. Über das gesamte Experiment hinweg wurden die Aortenringe stufenweise auf eine bleibende Vordehnung von 10mN gespannt und diese in weiteren 30min ausbalanciert, um die Bedingungen für eine Vasokonstriktion zu optimieren. Die Konstriktion der Aortenringe wurde durch den α₁-Rezeptoragonisten Phenylephrin-HCl (5μM/l) induziert. Sobald ein *Steady State* der Vasokonstriktion erreicht wurde, wurden verschiedene Wirkstoffe in ansteigender Konzentration hinzugefügt. Ein eingebautes zu- bzw. abführendes Pumpsystem ermöglichte es, nach einzelnen Messungen die den Wirkstoff enthaltende Tyrodelösung abzulassen und durch frische Tyrodelösung zu ersetzen. Die Waschschrte wurden zwischen den einzelnen Untersuchungen dreimal wiederholt [Wassmann 2004].

Die endotheliale Dysfunktion äußert sich in der Abschwächung der endothelabhängigen Relaxation [Daiber 2006]. Diese kann durch direkte Parasympathomimetika mit muskarinenger Wirkung wie z.B. Acetylcholin und Carbachol überprüft werden. In einem intakten Gefäß führt die Stimulation

muskarinergere Rezeptoren im Endothel zu einer Stimulation der endothelialen NO-Synthase. Hingegen führt eine Stimulation der gleichen Rezeptoren an der glatten Muskulatur zu einer Vasokonstriktion [Zeiber 1994]. Daher ist die Reaktion der Aorta in erster Linie von der funktionellen Integrität des Endothels abhängig. Bei intakter Endothelfunktion überwiegt die NO-Bildung und führt zu einer Vasodilatation. Hingegen überwiegen bei einer endothelialen Dysfunktion die glattemuskulären Effekte, die zu einer sog. paradoxen Vasokonstriktion führen [Rosenberger 1998; Schächinger 1995; Zeiber 1995]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur Messung der endothelabhängigen Vasodilatation Carbachol (Carbamylcholinchlorid, 1nM-100µM/l) verwendet. Die durch Carbachol induzierte Relaxation wurde durch die Zugabe des NO-Synthase-Inhibitors NG-Nitro-Argininmethylester (L-NAME, 1µM/l, Sigma-Aldrich) wieder behoben. Eine Relaxation der Aortenringe infolge des Carbachols, die geringer als 10% war, galt als Ausschlusskriterium, da eine mögliche Zerstörung des Endothels während der Präparation angenommen werden musste. Zur Überprüfung der Funktion der glattemuskulären Bereiche der Aortenringe wurde die endothelunabhängige Relaxation untersucht. Hierzu wurde der NO-Donator Glycerintrinitrat (10nM-10µM/l) verwendet.

Man erhielt kumulative Dosis-Wirkungs-Kurven für Carbachol (endothelabhängige Relaxation) und Glycerintrinitrat (endothelunabhängige Relaxation). Die Ergebnisse sind in Prozent der maximalen durch Phenylephrin induzierten Vasokonstriktion gegenüber dem Logarithmus der Carbachol- bzw. Glycerintrinitratkonzentration angegeben.

3.2.12 Quantifizierung der Atherogenese

Im Anschluss an eine sechs- bzw. achtwöchige Behandlung mit Aleglitazar bzw. Kontrolllösung wie oben beschrieben, wurde ApoE^{-/-}-Mäusen das Herz samt der *Aorta ascendens* entnommen. Das gewonnene Gewebe wurde in einem Aluminiumförmchen mit speziellem Einbettmedium für Gefrierschnitte (*Tissue Freezing Medium*) überschichtet und schockgefroren. Proben, die nicht sofort weiterverarbeitet werden konnten, wurden bei -80°C gelagert. Beginnend an der Herzspitze durch die Klappenebene bis zur *Aorta ascendens*, wurden am Leica

Kryostat 10µm dicke Schnitte angefertigt. Die Schnitte wurden auf Objektträger vom Messer abgenommen, bei Raumtemperatur getrocknet und im Anschluss mit Ölrot (Solvent Red, Clin Tech), das zur Lipiddarstellung, insbesondere auch lipidhaltiger atherosklerotischer Plaques dient, gefärbt. Die Gefrierschnitte wurden 30min in 4%igem Formalin fixiert, mit destilliertem Wasser gewaschen und 2min in eine 60%ige Isopropanollösung eingetaucht. Nach der 120min dauernden Färbung mit der Ölrot-Gebrauchslösung wurden nach 3 Waschschritten mit destilliertem Wasser die noch nassen Schnitte mit Aquatex eingedeckt [Wassmann 2004]. Pro Versuchstier wurden mindestens 25 hintereinandergeschaltete Schnitte analysiert.

Die mit Ölrot angefärbte Fläche und die Gesamtfläche des Aortenlumens wurden mithilfe des Mikroskops Nikon E600 und der NIS 3.0 BR Software fotografiert und ausgemessen. Die angefärbten Flächen wurden als atherosklerotische Plaques gewertet. Die Fläche der atherosklerotischen Plaques wurde als Prozentanteil der Gesamtfläche des Aortenlumens angegeben.

3.2.13 Telomeraseaktivitätsmessung nach dem *Telomere Repeat Amplification Protocol*

Im Zellkern eukaryotischer Zellen befinden sich die Chromosomen, welche aus linearen Strängen an Proteine angelagerter DNA bestehen. Die Chromosomen besitzen stabilisierende Endstücke, die als Telomere bezeichnet werden. Unter Telomeren versteht man repetitive guaninreiche und hochkonservierte Sequenzen sowie die mit ihnen assoziierten Proteine wie die humanen Telomerbindungsproteine TRF1 und TRF2. Die Telomere bilden mit verschiedenen Regulationsproteinen an den Enden der Chromosomen sog. *T-Loop* Strukturen und schützen so das Genom vor dem Abbau während der Zellteilung [Blasco 2005]. Die Telomerlänge der im Blut zirkulierenden Leukozyten ist mit der kardiovaskulären Morbidität und Mortalität assoziiert und kann deshalb als Indikator für die Wirksamkeit therapeutischer Effekte verwendet werden [Brouillette 2007; Farzaneh-Far 2008; Wong 2008]. Die Hauptkomponente des Telomerkomplexes bildet das Enzym Telomerase, das die Stabilität der Chromosomen reguliert und durch das Ersetzen der Telomerfragmente, die in der S-Phase des Zellzyklus verloren gegangen sind, einem Verlust der

Teilungsfähigkeit der Zelle und somit der Zellalterung bzw. Seneszenz entgegenwirkt. Sie ist ein Ribonukleoproteinkomplex, der aus einer RNA-Untereinheit und weiteren Untereinheiten besteht, und die enzymatische Aktivität einer reversen Transkriptase besitzt. Die Funktionsweise, mit der die Telomerase die Enden der Chromosomen verlängert, ist noch unvollständig verstanden.

Die Telomeraseaktivität wurde in humanen EPC nach dem *Telomere Repeat Amplification Protocol* (TRAP-Assay), einer enzymatischen Reaktion in Verbindung mit einer Amplifikation durch PCR, bestimmt [Kim 1997]. Die isolierten zellulären Proteine wurden mit einem zu den Telomerrepeats komplementären ACX-Primer (DNA-Template für Telomerase und *Forward*-Primer für anschließende PCR) 30min bei 30°C inkubiert, und direkt im Anschluss die durch die Telomerase verlängerten Nukleinsäuresequenzen im Rahmen einer *real time*-PCR amplifiziert. Als *Reverse*-Primer für die PCR diente der TS-Primer. Der gesamte Reaktionszyklus erfolgte in einem Glaskapillarsystem, welches für die Durchführung der PCR in einem LightCycler3 Instruments-Gerät (Roche) verwendet wurde.

Nach einer viertägigen Kultivierung von 1×10^7 MNC auf mit Fibronectin (10µg/ml) beschichteten 6-Well-Platten in EBM mit Zusätzen, die aus venösem Blut gesunder Probanden wie beschrieben isoliert wurden, erfolgte die Stimulation mit Aleglitazar (10nM/l und 100nM/l), Pioglitazon (10µM/l; Cayman Chemicals) bzw. Kontrolllösung. 24 Stunden nach Beginn der Stimulation wurde das EBM abgesaugt und mit 1xPBS gewaschen, um Mediumrückstände zu entfernen. Im Anschluss wurden pro Well 100µl TRAPeze 1xChaps Lysis Buffer pipettiert und die Zellen mit einem sterilen Zellschaber vorsichtig abgekratzt und in Eppendorfgefäße überführt. Die Suspension wurde für 30min bei 4°C inkubiert und dann zentrifugiert (4000rpm, 4°C, 20min). Der so entstandene Überstand, in dem sich die Proteine befanden, wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt, mit je 2µl RNasin versehen und die Proteinkonzentration bestimmt oder bis zur Durchführung der Assays bei -20°C gelagert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der LOWRY-Methode wie in Kapitel 3.2.14 beschrieben. Die Messung der Telomeraseaktivität wurde an 1µg EPC-Proteinextrakten in 5µl 1xCHAPS Lysis Buffer durchgeführt. Die 5µl Probematerial wurden standardmäßig mit einem Mastermix aus je 10,6µl PCR-Wasser, 2µl Primermischung (1µl [0,1µg] TS-Primer (Template) und 1µl [0,05µg] ACX-Primer), 0,4µl MgCl₂ [1,5mM] und 2µl Fast Start SYBR Green PCR Master Mix (Roche),

versetzt. Das Gemisch wurde in Glaskapillaren umgefüllt und 30min bei 30°C inkubiert, um eine Elongation der Templates durch die Telomeraseaktivität zu ermöglichen. Danach wurden die Kapillaren in den LightCycler überführt. In diesem wurden Telomerase und DNA 10min bei 90°C denaturiert und gleichzeitig die im Master-Mix enthaltene DNA-Polymerase aktiviert. Dem folgte eine PCR mit 40 Amplifikationszyklen (jeweils 20s bei 95°C, 30s bei 60°C und 50s bei 72°C). Als Positivkontrolle dienten in jedem Experiment Proteinextrakte menschlicher embryonaler Nierenzellen (HEK293, Gibco), als Negativkontrolle der TRAPeze CHAPS-Lysispuffer.

Die Telomeraseaktivität wurde in % der Telomeraseaktivität der Kontrollzellen als HEK-Zelläquivalent angegeben.

3.2.14 Proteinexpression und Western Blot

Der Western Blot stellt eine molekularbiologische Methode zum Nachweis und zur Quantifizierung der Proteinexpression dar. Die Proteine werden zunächst nach ihrem Molekulargewicht durch Gel-Elektrophorese aufgetrennt und anschließend auf eine Trägersmembran aufgebracht, auf der der Nachweis z.B. durch Immunodetektion, wie im Rahmen dieser Arbeit, erfolgt.

Nach einer viertägigen Kultivierung von 1×10^7 MNC auf mit Fibronectin (10µg/ml) beschichteten 6-Well-Platten in EBM mit Zusätzen, die aus venösem Blut gesunder Probanden wie beschrieben isoliert wurden, erfolgte die Stimulation mit Aleglitazar (10nM/l und 100nM/l), Pioglitazon (10µM/l; Cayman Chemicals) bzw. Kontrolllösung. 24 Stunden nach Beginn dieser Stimulation wurde das EBM abgesaugt und mit 1xPBS gewaschen, um Mediumrückstände zu entfernen. Um die Zellen zu lysieren und so eine Bestimmung zelleigener Proteine zu verbessern, wurden 50-100µl Proteinlysepuffer mit zugesetzten Proteaseinhibitoren auf jede Zellkulturschale pipettiert. Mithilfe eines sterilen Zellschabers wurden die Zellen von der Unterfläche abgehoben, das Gemisch in ein Eppendorfgefäß überführt und, um die Denaturierung der Proteine sicherzustellen, bei 95°C auf einem Heizblock 4min erhitzt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration im Gesamtzelllysat erfolgte nach der kalorimetrischen Methode von *Lowry* [Lowry 1951]. In einem ersten Schritt

entstand in alkalischer Lösung durch die Zugabe des ersten Reagenz (D_c Protein Assay Reagent A, Biorad®) ein Kupfer-Protein-Komplex. Dieser reduzierte das zweite Phosphomolybdat-Phosphowolfram-Reagenz (D_c Protein Assay Reagent B, Biorad®). In Abhängigkeit von der Proteinkonzentration färbte sich die Lösung mehr oder weniger intensiv blau an. Die Absorption der Lösung wurde im Anschluss bei 540nm am UV/Vis Spectrophotometer DU 730 (Beckmann Coulter) detektiert.

Um eine Vergleichbarkeit der Konzentration des zu untersuchenden Proteins verschiedener Versuchsgruppen zu gewährleisten, wurden jeweils 50µg des Gesamtproteinlysats auf ein SDS-Polyacrylgel (10% bzw. 12% je nach Primärantikörper) geladen und in Anwesenheit einer äquivalenten Menge eines β-Mercaptoethanolpuffers (Protein-Ladepuffer) elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine aus dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen (Blotten). Dazu wurde ein Transferpuffer, Filter und die *Semi-Dry-Transfer-Cell* (Bio-Rad) benutzt. Um freie Oberflächenbindungsstellen zu blocken, wurde die Membran nach dem Blotvorgang 30min in einer 5%-Trockenmilchlösung auf einem langsam eingestellten Schüttler belassen.

Danach wurde die Membran mit spezifischen Antikörpern in 1%-Trockenmilch über Nacht auf einem Schüttler bei 4°C inkubiert, um auf ihr die unterschiedliche Proteinexpression zu untersuchen. Folgende Primärantikörper wurden verwendet: GAPDH (*mouse monoclonal IgG anti-glyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase*, 6C5:sc-32233, Santa Cruz Biotechnology; Verdünnung 1:4000), eNOS (*rabbit polyclonal IgG anti-eNOS*, Acris Antibodies; Verdünnung 1:500), p-eNOS (*mouse monoclonal IgG anti-p-eNOS* S1177, BDI250, Acris Antibodies; Verdünnung 1:500), Akt (*rabbit polyclonal IgG anti-total Akt*, #9272, Cell Signaling Technology; Verdünnung 1:1000), p-Akt (*rabbit polyclonal IgG anti-p-Akt [Ser473]*, #9271, Cell Signaling Technology; Verdünnung 1:1000), p53 (*rabbit polyclonal IgG anti-p53*, FL-393, sc-6243, Santa Cruz; Verdünnung 1:500) und Bcl-2 (*rabbit polyclonal IgG anti-Bcl-2*, sc-492, SantaCruz; Verdünnung 1:500). Die nicht gebundenen Antikörper wurden am Folgetag in mehreren Waschschritten mit PBS-Tween-Lösung abgewaschen. Im Anschluss wurde die Membran mit einem peroxidasekonjugierten *Goat-Anti-Rabbit*-Antikörper bzw. *Goat-Anti-Mouse*-Antikörper (beide Sigma-Aldrich; Verdünnung 1:5000) 20-30min bei Raumtemperatur inkubiert. Die ungebundenen

Antikörper wurden mit PBS-Tween-Lösung in mehreren Waschschritten abgewaschen und unter der Nutzung eines etablierten ECL-Kits (*enhanced chemiluminescence*; GE Healthcare) die an die Proteinbanden gebundenen Fragmente auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht.

Die Intensitäten der Western Blot-Banden wurden densitometrisch analysiert und alle Werte im Verhältnis zur GAPDH normiert.

3.2.15 PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Die PCR (*polymerase chain reaction*) ermöglicht die gezielte Amplifikation ausgewählter Sequenzbereiche. In der vorliegenden Arbeit diente sie dazu, die Expression der PPAR- α und PPAR- γ in EPC nachzuweisen, sowie die Expression der PPAR-Zielgene im Lebergewebe von ApoE^{-/-}-Mäusen zu detektieren.

3.2.15.1 Semiquantitative PCR

Nach einer viertägigen Kultivierung von 2×10^7 Zellen auf mit Fibronectin (10 μ g/ml) beschichteten 6-Well-Platten in EMB mit Zusätzen, die aus venösem Blut gesunder Probanden wie beschrieben isoliert wurden, wurde die RNA wie folgt isoliert: Nach dem Absaugen des Mediums wurden die Kulturschalen mit 1xPBS gewaschen und unter dem Abzug 1ml RNA-Pure (peqGold RNAPure, Peqlab) zur Zelllyse hinzugegeben. Das Zelllysate wurde mit einem sterilen Zellschaber von der Unterfläche gelöst, in ein Eppendorfgefäß überführt und die Proteine durch Zugabe von 300 μ l Chloroform entfernt. In der nachfolgenden Zentrifugation (14000rpm, 30min, 4°C) bildeten sich 3 Phasen, von denen die wässrige Oberphase vorsichtig in ein neues Eppendorfgefäß pipettiert und mit 400 μ l eisgekühltem Isopropanol versetzt wurde. Einer einstündigen Lagerung der Probe bei -20°C folgte eine weitere Zentrifugation (14000rpm, 60min, 4°C). Nach dem vorsichtigen Absaugen des Überstandes und Zugabe von 800 μ l eisgekühltem Ethanol (70% in RNase-freiem Wasser) zum Waschen des Pellets, wurde nochmals zentrifugiert (14000rpm, 15min, 4°C). Das ausgebildete Pellet wurde nach Absaugen des Überstandes mindestens 30min bei Raumtemperatur unter dem Abzug getrocknet. Die getrockneten Pellets

(isolierte Gesamt-RNA) wurden gründlich in 20µl RNase-freiem Wasser resuspendiert, 5min bei 65°C auf dem Heizblock inkubiert und zum Schluss am Nanodrop ND-2000 Spectrophotometer quantifiziert.

Zur Herstellung der cDNA aus der isolierten Gesamt-RNA der EPC, wurde für die reverse Transkription von 2µg der Gesamt-RNA das *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems) verwendet. Die 2µg RNA wurden auf 12µl mit RNase freiem Wasser aufgefüllt und mit 2µl 10xRT-Puffer (Quiagen), 2µl dNTP (5mM, Quiagen), 2µl Random-Primer (Roche), 1µl RNase-Inhibitor RNasin (10U/µl, Promega) sowie 1µl Omniscript RT-Enzym (Quiagen), versetzt. Die nachfolgende einstündige Inkubation bei 37°C wurde durch Erhitzen auf 95°C für 5min terminiert, indem die reverse Transkriptase auf diese Weise inaktiviert wurde. Die so synthetisierte cDNA wurde bis zu ihrer Verwendung bei -20° C gelagert.

Nach der Isolation der Gesamt-RNA und Umschreiben auf cDNA wurden die PCRs durchgeführt, um die Expression der PPAR-α und PPAR-γ auf der Ebene der mRNA beurteilen zu können. Zu 2µl RT-Produkt kamen standardmäßig 48µl eines PCR-Mastermixes (1µl *Forward*-Primer, 1µl *Reverse*-Primer, 1µl DNTP-Mix [10mM/I], 5µl 10xPCR-Puffer, 0,2µl Taq-Polymerase, 38,8µl Ampuwa). Nach anschließendem Vortexen und Herunterzentrifugieren der Proben, durchliefen sie im ThermoCycler die Reaktionsschritte der PCR. Ein typischer PCR-Lauf bestand aus dem initialen Denaturierungsschritt für 5min bei 95°C, 60 PCR-Zyklen (60s bei Primer-Annealing-Temperatur von 60°C; 90s bei 72°C Taq-Polymerase-Arbeitstemperatur; 60s bei 95°C Denaturierungstemperatur) und einer abschließenden Amplifikation (10min bei 72°C). Folgende Oligonukleotide wurden als Primer für die PCR verwendet: PPAR-α *forward*: 5'-TGAACAAAGACGGGATG-3'; PPAR-α *reverse*: 5'-TCAAACCTTGGGTTCCATGAT-3'; PPAR-γ *forward*: 5'-CATGCTTGTGAA GGATGCAAG-3'; PPAR-γ *reverse*: 5'-TTCTG AAACCGACAGTACTGACAT-3'.

Zur Beurteilung der PCR-Ergebnisse wurde mit dem PCR-Produkt eine DNA-Gelelektrophorese auf einem 1,2%igen Agarose-Gel in 1xTAE als Ladepuffer durchgeführt. 5µl 1kbPlus DNA-Ladder (Invitrogen) diente dabei als DNA-Längenstandard. Die Gele wurden mithilfe des Gene Genius Imaging Systems (Syngene) fotografiert und mit der zugehörigen Software ausgewertet.

3.2.15.2 Quantitative *real time*-PCR

Die *real time*-PCR basiert auf der herkömmlichen PCR mit zusätzlicher Möglichkeit zur Quantifizierung der neu gebildeten DNA [Clegg 1993].

Lebergewebe mit Aleglitazar behandelte ApoE^{-/-}-Mäuse, das nach der Entnahme schockgefroren und bei -80°C gelagert wurde, wurde homogenisiert, die Gesamt-RNA isoliert und auf cDNA umgeschrieben. Es wurde, wie bereits in Kapitel 3.2.15.1 beschrieben, verfahren.

Zu 3µl der cDNA wurden für den PCR-Ansatz jeweils 17µl Mastermix (7µl SYBR Mix, 0,5µl *Forward*-Primer, 0,5µl *Reverse*-Primer, 9µl RNase freies Wasser) pipettiert. Die quantitativen *real time*-PCR-Reaktionen erfolgten mithilfe eines *StepOne Plus Real-Time PCR System*-Gerätes (Applied Biosystems). Ein typischer PCR-Lauf setzte sich aus einem Aktivierungsschritt bei 95°C gefolgt von 40 PCR-Zyklen (15s bei 95°C und 60s bei 60°C) zusammen. Folgende Primer wurden verwendet (angepasst nach Lee et al.[Lee 2006]): Acyl-CoA-Oxidase (ACO; BC054727.1) *forward*: 5'-TGTTTAAGAAGAGTGCCACCAT-3'; *reverse*: 5'-ATAAGTGCCCGTGATCTCCA-3'; *fatty acid binding protein* (FABP3; BC089542.1) *forward*: 5'-CCCCTCAGCTCAGCACCAT-3'; *reverse*: 5'-CAGAAAAATCCCAACCCAAGAAT-3'; Carnitin-Palmitoyl-Transferase 1(CPT1; NM013495.2) *forward*: 5'-AACCCAGTGCCTTAACGATG-3'; *reverse*: 5'-GAACTGGTGGCCAATGAGAT-3'.

Die PCR-Daten wurden unter Verwendung der komparativen Ct ($2^{-\Delta\Delta CT}$)-Methode angegeben. Um die relativen Unterschiede in der mRNA-Expression zwischen der Behandlungs- und Kontrollgruppe berechnen zu können, wurde 18s als *housekeeping mRNA* verwendet.

3.2.16 Auswertung und Statistik

Soweit nicht anders beschrieben, wurden alle Ergebnisse als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (MW \pm SEM) aufgeführt. Zur statistischen Analyse wurde die GraphPrism Software Version 5.0 und IBM® SPSS Statistics Software

Version 19.0 verwendet. Statistische Analysen zweier oder mehrerer Gruppen erfolgten mittels t-Test oder ANOVA. Auch diese Ergebnisse wurden als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes angegeben. Der Neuman-Keuls-Test wurde für Post-Hoc-Vergleiche verwendet. Für die Ergebnisse der aufeinanderfolgenden Glukosespiegelmessungen (Glukosetoleranztest) und der Messungen der endothelialen Relaxation der Aorta infolge verschiedener Carbachol- und Glycerintrinitratkonzentrationen wurden ein allgemeines lineares Modell für Messwiederholungen und der Wilks-Lambda-Test für die Gruppenvergleiche benutzt. Werte von $p < 0,05$ wurden als signifikant angesehen.

4 Ergebnisse

4.1 Auswirkungen der Aleglitazarbehandlung der C57Bl/6-WT- und ApoE^{-/-}-Mäuse

4.1.1 Auswirkungen auf das Körpergewicht, Herzfrequenz, systolischen und diastolischen Blutdruck

Der systolische und diastolische Blutdruck sowie die Herzfrequenz veränderten sich unter der Behandlung mit Aleglitazar bei den C57Bl/6-WT- und bei ApoE^{-/-}-Mäusen in ähnlicher Weise (**Tabelle 1**). Das Körpergewicht der C57Bl/6-WT-Mäuse blieb während der dreiwöchigen Behandlungsperiode ebenfalls konstant (Ausgangsgewicht: 21,6±1,5g; Gewicht nach Behandlung: 21,7±1,0g). Die ApoE^{-/-}-Mäuse haben während der sechswöchigen Behandlungsperiode etwa 20% an Gewicht zugenommen. Die relative Gewichtszunahme der Behandlungsgruppe (Ausgangsgewicht: 18,8±0,8g; Gewicht nach Behandlung: 22,9±0,7g) entsprach dabei der Gewichtszunahme der Kontrollgruppe (Ausgangsgewicht: 21,7±2,1g; Gewicht nach Behandlung: 26,0±2,1g).

	C57Bl/6 + Kontrolllösung			C57Bl/6 + Aleglitazar 10mg/kg/d		
	Woche 1	Woche 2	Woche 3	Woche 1	Woche 2	Woche 3
Körpergewicht (g)	21,6 ± 1,5	21,1 ± 1,0	21,7 ± 1,0	21,8 ± 1,9	22,0 ± 0,3	22,1 ± 0,6
Herzfrequenz (min ⁻¹)	576 ± 29	651 ± 14	635 ± 36	641 ± 34	663 ± 13	703 ± 21
Systolischer BD (mmHg)	113 ± 6	128 ± 1	116 ± 3	118 ± 5	118 ± 6	120 ± 1
Diastolischer BD (mmHg)	77 ± 6	90 ± 5	77 ± 2	75 ± 5	83 ± 5	81 ± 2

	ApoE ^{-/-} + Kontrolllösung					
	Woche 1	Woche 2	Woche 3	Woche 4	Woche 5	Woche 6
Körpergewicht (g)	21,7 ± 2,1	22,7 ± 2,0	23,5 ± 2,0	24,5 ± 2,0	25,3 ± 2,1	26,0 ± 2,1
Herzfrequenz (min ⁻¹)	584 ± 17	641 ± 7	599 ± 19	619 ± 30	582 ± 22	581 ± 23
Systolischer BD (mmHg)	129 ± 6	140 ± 3	111 ± 3	123 ± 4	118 ± 5	120 ± 8
Diastolischer BD (mmHg)	88 ± 4	96 ± 4	76 ± 3	81 ± 1	85 ± 6	80 ± 6

	ApoE ^{-/-} + Aleglitazar 10mg/kg/d					
	Woche 1	Woche 2	Woche 3	Woche 4	Woche 5	Woche 6
Körpergewicht (g)	18,9 ± 0,8	20,1 ± 0,7	20,7 ± 0,8	21,1 ± 0,8	22,1 ± 0,7	22,9 ± 0,7
Herzfrequenz (min ⁻¹)	516 ± 12	527 ± 20	575 ± 15	629 ± 22	608 ± 10	604 ± 17
Systolischer BD (mmHg)	113 ± 7	116 ± 5	122 ± 3	124 ± 8	122 ± 4	119 ± 6
Diastolischer BD(mmHg)	81 ± 4	79 ± 3	73 ± 3	77 ± 4	82 ± 2	76 ± 2

Tabelle 1:

Auswirkungen der Behandlung mit Aleglitazar bzw. Kontrolllösung auf das Körpergewicht, die Herzfrequenz, den systolischen und diastolischen Blutdruck (BD) der Versuchstiere. Alle Werte sind als Mittelwerte±SEM angegeben.

4.1.2 Die Aleglitazarbehandlung normalisiert die Glukosetoleranz in ApoE^{-/-}-Mäusen

Die gestörte Glukosetoleranz (*Impaired glucose tolerance*, IGT) bezeichnet ein klinisch bedeutsames Übergangsstadium zwischen der normalen Glukosetoleranz und dem Diabetes mellitus Typ 2 [Roumen 2008]. Darüber hinaus ist sie mit einer endothelialen Dysfunktion und einer chronischen Entzündungsreaktion assoziiert [Sixt 2008]. Aktuelle Studien bestätigen eine hohe Inzidenz kardiovaskulärer Ereignisse bei Patienten mit einer gestörten Glukosetoleranz [Leschke 2006].

Die peritonealen Glukosetoleranztests zeigten, dass ApoE^{-/-}-Mäuse nach 6 Wochen Fütterung mit der *Western Type*-Diät eine gestörte Glukosetoleranz entwickelt hatten. Diese gestörte Glukosetoleranz konnte durch die Behandlung mit Aleglitazar verhindert werden. Im Gegensatz dazu hatten C57Bl/6-WT-Mäuse, die regulär gefüttert wurden, keine gestörte Glukosetoleranz entwickelt, so dass die Behandlung mit Aleglitazar keinen Einfluss auf die Blutzuckerkonzentration hatte (**Abbildung 6**). Bei unbehandelten ApoE^{-/-}-Mäusen unter Fettfütterung lag die Nüchternglukosekonzentration im Mittelwert bei 112±13,6mg/dl. Das Maximum des postprandialen Glukoseanstiegs nach intraperitonealer Injektion von 1,5mg/kg KG Glukose lag nach 20min bei 302±23,7mg/dl. Wurden die ApoE^{-/-}-Mäuse zusätzlich zu der Fettfütterung mit Aleglitazar (10mg/kg KG i.p.) behandelt, zeigte sich eine Reduktion des Nüchternglukosewertes auf 98±3,4mg/dl sowie des maximalen postprandialen Glukoseanstiegs nach 20min auf 224±21,6mg/dl. Diese Werte sind mit denen unbehandelter regulär gefütterter C57Bl/6-WT-Mäuse vergleichbar

(Nüchternglukosewert: $120 \pm 3,8$ mg/dl; maximale postprandiale Glukosekonzentration nach 20min: $236 \pm 21,7$ mg/dl).

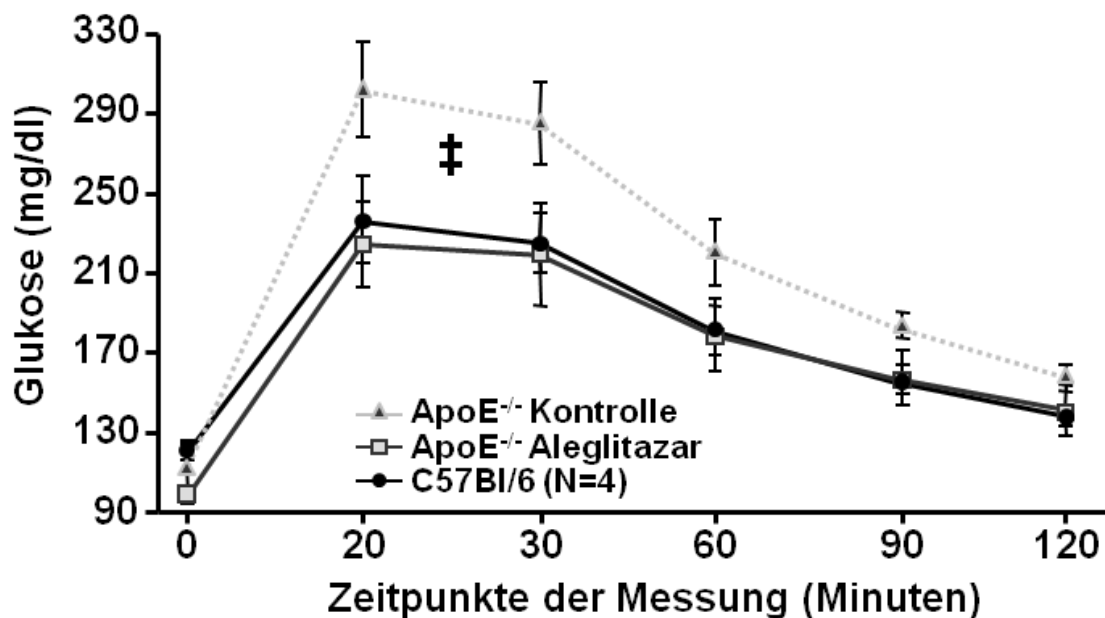


Abbildung 6:

Die Glukosetoleranztests zeigen den Zeitverlauf der Glukosekonzentrationen im Serum regulär gefütterter unbehandelter C57Bl/6-WT- und ApoE^{-/-}-Mäuse auf der *Western Type*-Diät nach einer intraperitonealen Glukoseinjektion (1,5mg/kg KG), die 6 Wochen mit Aleglitazar 10mg/kg KG oder Kontrolllösung behandelt wurden. Der statistische Vergleich erfolgte über die Fläche unter der Kurve (*area under the curve, AUC*) (n=6, wenn nicht anders angegeben; $\#p < 0,001$ unbehandelte ApoE^{-/-}-Kontrollgruppe im Vergleich zu unbehandelten C57Bl/6-WT-Mäusen und ApoE^{-/-}-Aleglitazargruppe).

4.1.3 Aleglitazar erhöht die Adiponektinkonzentration im Serum

Das Hormon Adiponektin ist ein vaskuloprotektives Adipokin, das v.a. von Adipozyten produziert wird und an der Regulation des Energie- und Fettstoffwechsels beteiligt ist. Es wird durch PPAR- γ -Agonisten wie Pioglitazon hochreguliert. Daher wurde Pioglitazon in der Untersuchung als Positivkontrolle für den PPAR- γ -Effekt verwendet [Werner C 2007].

Die Behandlung mit Aleglitazar 10mg/kg KG i.p. führte sowohl bei C57Bl/6-WT-Mäusen, als auch bei hypercholesterinämischen ApoE^{-/-}-Mäusen auf der *Western*

Type-Diät, zu einem signifikanten Anstieg der Adiponektinkonzentration im Serum, die mittels ELISA bestimmt wurde.

Bei C57Bl/6-WT-Mäusen stieg die Adiponektinkonzentration nach 3 Wochen unter Aleglitazar auf $360 \pm 62\%$ der Adiponektinkonzentration vor Beginn der Behandlung im Vergleich zu $54 \pm 10\%$ der mit Kontrolllösung behandelten Gruppe ($n=4$, $p<0,001$). Bei ApoE^{-/-}-Mäusen war die Adiponektinkonzentration nach der Behandlung mit Aleglitazar im Vergleich zu $99 \pm 36\%$ der Kontrollgruppe auf $350 \pm 121\%$ ($n=4$, $p<0,001$) der Ausgangskonzentration erhöht (**Abbildung 7**).

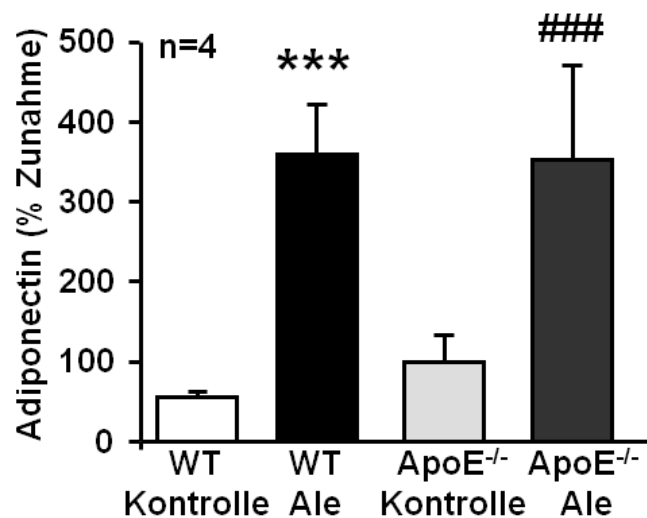


Abbildung 7:

Adiponektinkonzentrationen im Serum (bestimmt mittels ELISA) von C57Bl/6-WT- bzw. ApoE^{-/-}-Mäusen (mit *Western Type*-Diät) vor und nach Behandlung mit Aleglitazar (10mg/kg KG i.p.) oder Kontrolllösung (3 bzw. 6 Wochen). Angabe in % Zunahme während der Behandlungsperiode ($n=4$; *** $p<0,001$ WT-Aleglitazargruppe im Vergleich zur WT-Kontrollgruppe; ### $p<0,001$ ApoE^{-/-}-Aleglitazargruppe im Vergleich zur ApoE^{-/-}-Kontrollgruppe). Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt.

4.1.4 Die Aleglitazarbehandlung erhöht die EPC-Anzahl

4.1.4.1 EPC-Quantifizierung mit der FACS-Analyse

Im Rahmen der FACS-Analyse wurde die Population der Sca-1/VEGFR-2 positiven endothelialen Progenitorzellen, die nach einer dreiwöchigen Behandlung mit Aleglitazar 10mg/kg KG bzw. Kontrolllösung aus C57Bl/6-WT-Mäusen isoliert wurden, quantifiziert. Die Behandlung mit Aleglitazar steigerte die Anzahl der im

peripheren Blut zirkulierenden Sca-1/VEGFR-2 positiven EPC im Vergleich zu den Kontrollen auf $153 \pm 10\%$ ($n=6$, $p<0,05$) (**Abbildung 8A**). Darüber hinaus führte sie auch zu einer Steigerung der Sca-1/VEGFR-2 positiven EPC im Knochenmark auf $197 \pm 22\%$ ($n=6$, $p<0,05$) (**Abbildung 8B**).

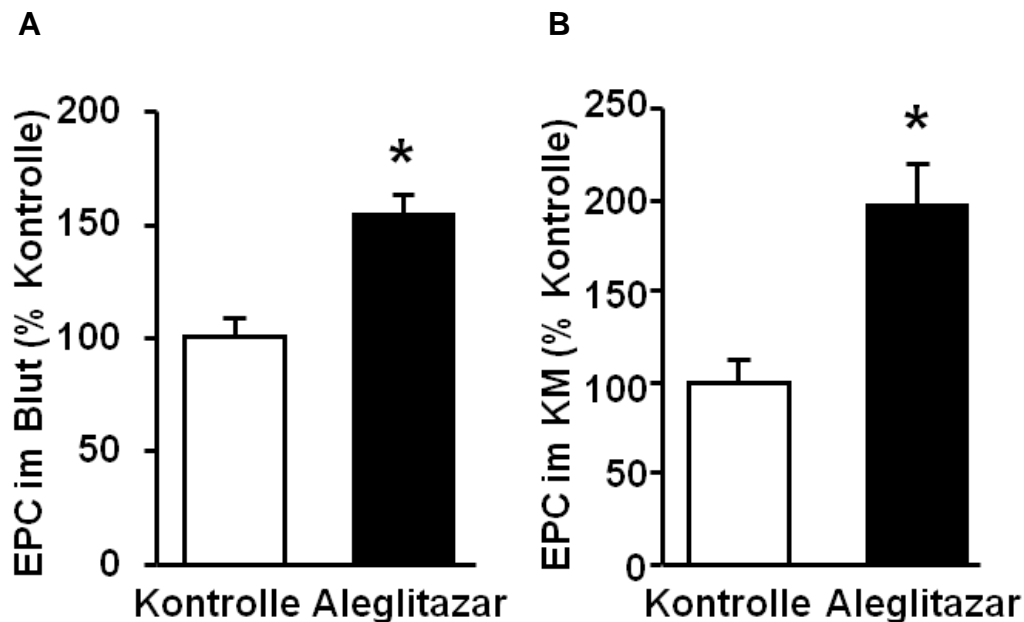


Abbildung 8:

Quantifizierung der Sca-1/VEGFR-2 positiven EPC mittels FACS-Analyse aus peripherem Blut (A) und aus dem Knochenmark (B) von C57Bl/6-WT-Mäusen, die 3 Wochen mit Aleglitazar (10mg/kg KG i.p.) bzw. mit Kontrolllösung behandelt wurden ($n=6$, $*p<0,05$). Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt.

4.1.4.2 EPC-Quantifizierung mit der DiLDL/Lectin-Färbung

Die endothelialen Progenitorzellen wurden durch die Aufnahme von Di-acetyliertem *Low Density* Lipoprotein (Di-ac-LDL) und Färbung mit FITC-markiertem *Ulex europaeus* Lectin identifiziert [Asahara 1997]. Die DiLDL/Lectin-Färbung stellt eine weitere etablierte Methode für ihre Quantifizierung dar. Zu diesem Zweck erfolgte die Selektion der EPC aus dem Pool mononukleärer Zellen der Milz in einer *in-vitro* Kultur.

Bei C57Bl/6-WT-Mäusen, die über einen Zeitraum von 3 Wochen mit Aleglitazar (10mg/kg KG i.p.) behandelt wurden, beobachteten wir im Vergleich zur Kontrollgruppe einen Anstieg der DiLDL/Lectin doppelt positiven EPC auf $182 \pm 8\%$

(n=5, $p<0,05$) (**Abbildung 9A**). Auch bei ApoE^{-/-}-Mäusen, die mit der *Western Type*-Diät gefüttert wurden, führte eine sechswöchige Behandlung mit Aleglitazar (10mg/kg KG i.p.) im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einer Hochregulation DiLDL/Lectin doppelt positiver EPC auf $171\pm6\%$ (n=11-12, $p<0,005$) (**Abbildung 9B**).

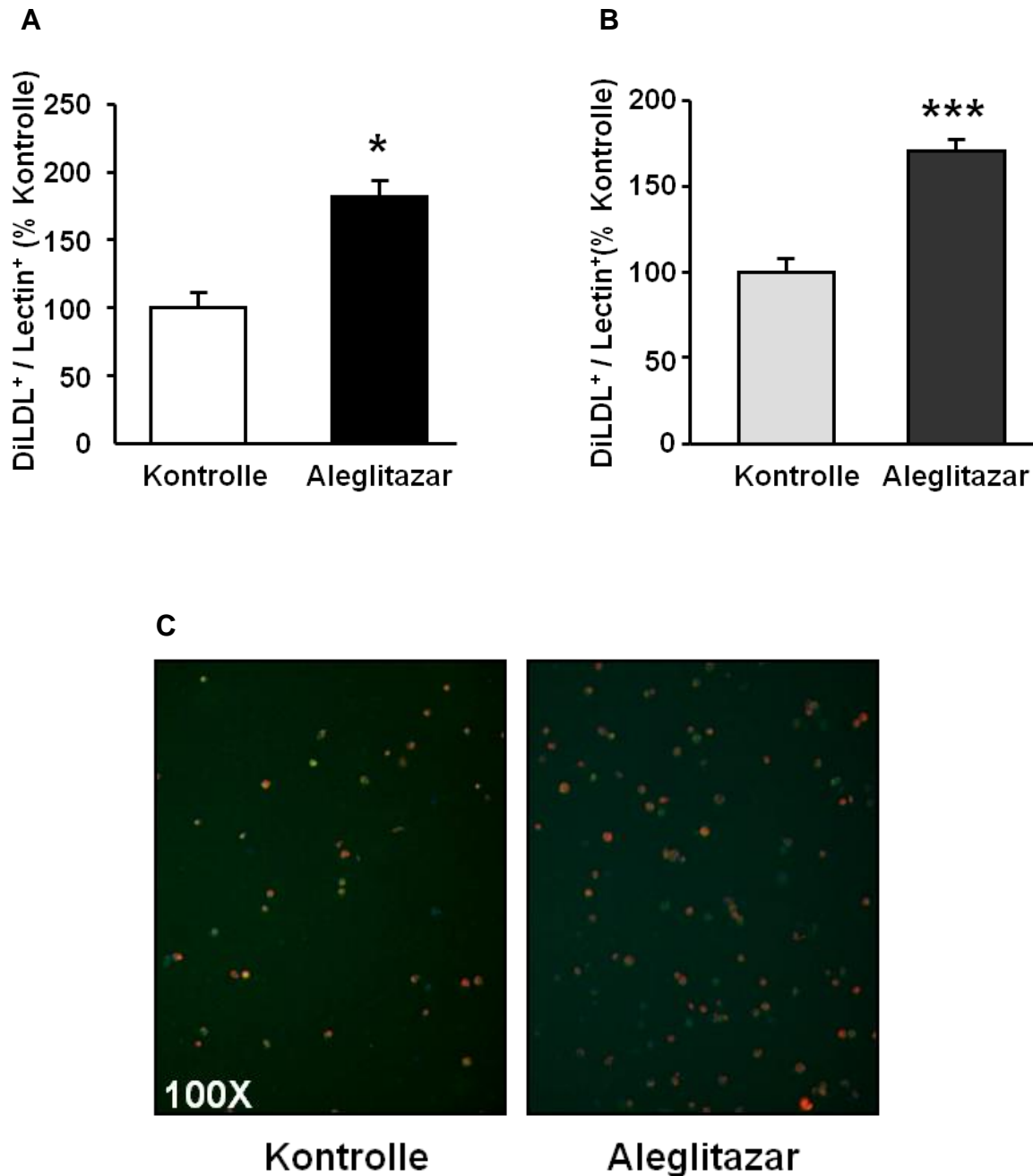


Abbildung 9:

(A) Quantifizierung DiLDL+/Lectin+ doppelt positiver EPC aus der Milz unbehandelter (Kontrolle) und 3 Wochen mit Aleglitazar (10mg/kg KG i.p.) behandelter C57Bl/6-WT-Mäuse (n=5, * $p<0,05$). (B) Quantifizierung DiLDL+/Lectin+ EPC aus der Milz unbehandelter (Kontrolle) und 6 Wochen mit Aleglitazar (10mg/kg KG i.p.) behandelter ApoE^{-/-}-Mäuse auf *Western Type*-Diät (n=11-12, *** $p<0,005$). Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt.

(C) Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Abbildungen DiLDL+/Lectin+ doppelt positiver EPC aus der Milz unbehandelter (Kontrolle) und 3 Wochen mit Aleglitazar (10mg/kg KG i.p.) behandelter C57Bl/6-WT-Mäuse in der 100x Vergrößerung (grün: FITC-Lectin, rot: DiLDL, blau: DAPI [Zellkerne]).

4.1.5 Die Aleglitazarbehandlung steigert die funktionelle Kapazität der EPC (Migrationsassay)

Ein wesentlicher Parameter der EPC-Funktion ist ihre migratorische Kapazität, die durch Stimuli wie *Stroma Derived Factor-1* (SDF-1) oder *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) ausgelöst werden kann. Sie befähigt die EPC zur Extravasation und Migration in die Gefäßwand [Vasa 2001]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die SDF-1-induzierte Migration der EPC in einer modifizierten Boyden Kammer bestimmt.

Eine dreiwöchige Behandlung der C57Bl/6-WT-Mäuse mit Aleglitazar (10mg/kg KG i.p.) erhöhte im Vergleich zu unbehandelten Kontrollgruppe die SDF-1-induzierte Migration durch die Poren der modifizierten Boyden Kammer auf $176 \pm 6\%$ ($n=6$, $p<0,05$) (**Abbildung 10A**). In ApoE^{-/-}-Mäusen, die mit der *Western Type*-Diät gefüttert wurden, führte eine sechswöchige Behandlung mit Aleglitazar (10mg/kg KG i.p.) ebenfalls zu einem Anstieg der durch SDF-1 angelockten migrierten Zellen auf $149 \pm 14\%$ im Vergleich zur Kontrollgruppe ($n=6$, $p<0,05$) (**Abbildung 10B**).

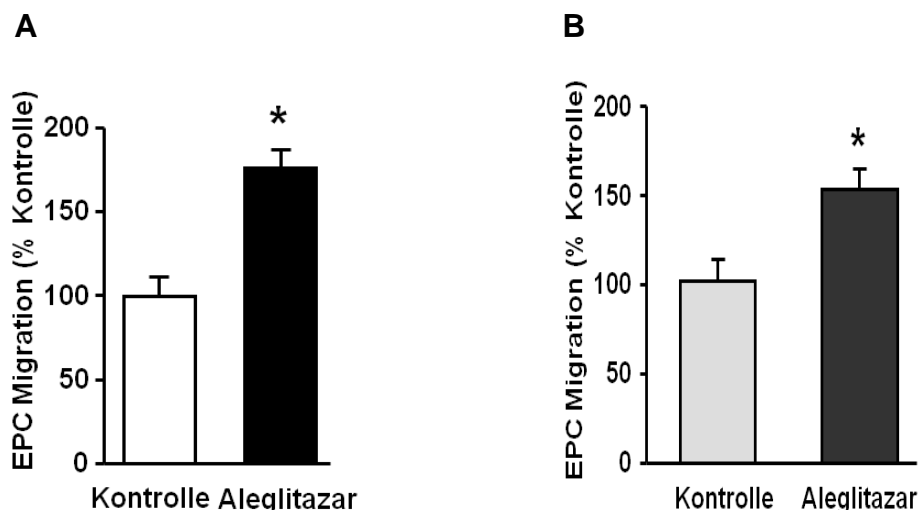


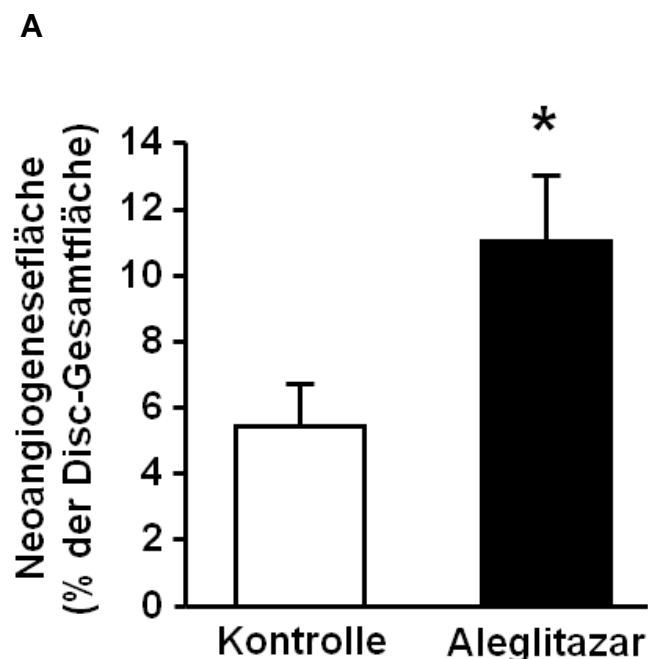
Abbildung 10:

(A) Auswirkung einer dreiwöchigen Behandlung von C57Bl/6-WT-Mäusen mit Aleglitazar (10mg/kg KG i.p.) bzw. Kontrolllösung auf die Migrationsfähigkeit der endothelialen Progenitorzellen (EPC) aus der Milz ($n=6$, $*p<0,05$).

(B) Auswirkung einer sechswöchigen Behandlung von ApoE^{-/-}-Mäusen (auf *Western Type*-Diät) mit Aleglitazar (10mg/kg KG i.p.) bzw. Kontrolllösung auf die Migrationsfähigkeit der endothelialen Progenitorzellen (EPC) aus der Milz (n=6, *p<0,05). Die Werte sind als Mittelwerte±SEM dargestellt.

4.1.6 Die Aleglitazarbehandlung steigert die Neoangiogenese

Wie schon erwähnt, gehört das Disc-Neoangiogenese-Modell zu den etablierten Methoden für die Beurteilung des Wachstums und der Funktionalität neu entstandener Kapillargefäße [Fajardo 1988]. Es ist bekannt, dass endotheliale Progenitorzellen das Potenzial haben, die Neoangiogenese zu verbessern [Asahara 1997]. Um die Effekte der Behandlung mit Aleglitazar (10mg/kg KG i.p.) bzw. Kontrolllösung auf die Neoangiogenese zu untersuchen, wurden C57Bl/6-WT-Mäusen Polyvinylschwämme subkutan implantiert und nach 20 Tagen zur Quantifizierung funktioneller neu gebildeter Kapillaren fluoreszierende Mikrosphären systemisch appliziert. Die Behandlung mit Aleglitazar führte fast zu einem zweifachen Anstieg der Neoangiogenese (Kontrollgruppe: 5,7±1,4%; Aleglitazargruppe: 10,1±1,8%; n=6, p<0,05)(Abbildung 11).



B

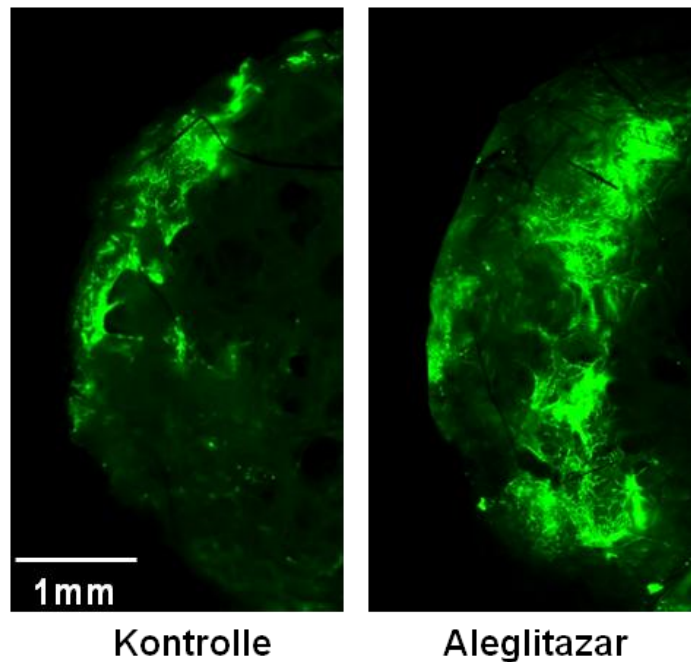


Abbildung 11:

(A) Quantifizierung der Disc-Neoangiogenese drei Wochen nach subkutaner Implantation der Polyvinylschwämme und nach Perfusion mit fluoreszierenden Mikrosphären bei C57Bl/6-WT-Mäusen, die 3 Wochen mit Aleglitazar (10mg/kg KG i.p.) oder Kontrolllösung behandelt wurden (n=6, *p<0,05). Die Werte sind als Mittelwerte±SEM dargestellt.

(B) Repräsentative mikroskopische Bilder (20x Vergrößerung) der vaskularisierten Randzone der perfundierten Discs der Kontrolltiere (links) und der mit Aleglitazar behandelten Versuchstiere (rechts).

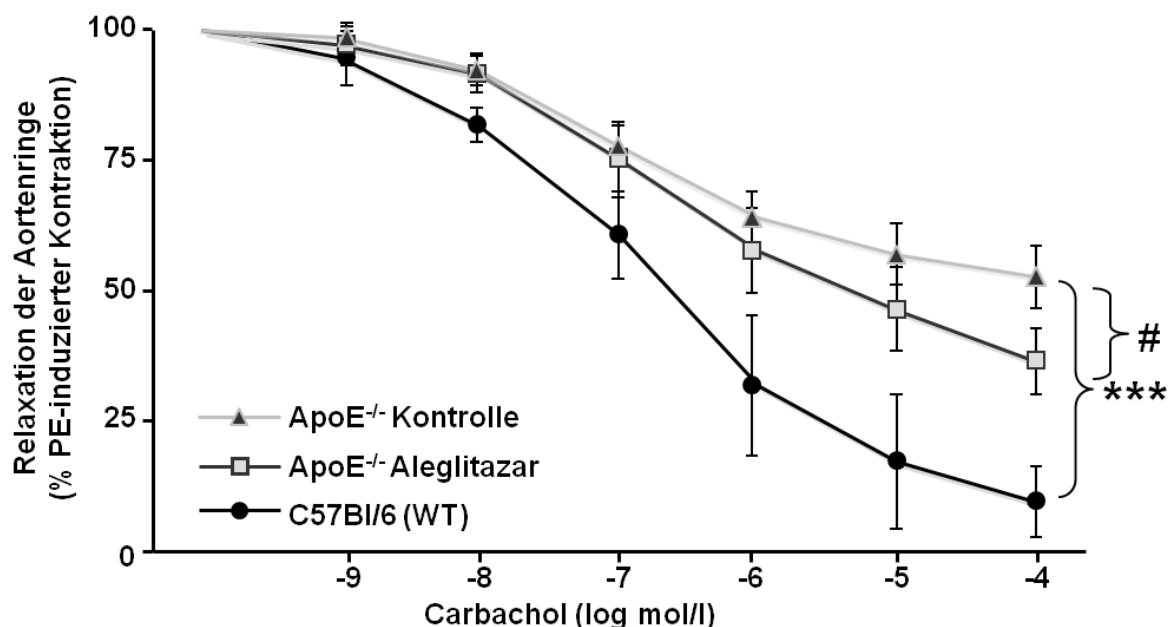
4.1.7 Auswirkungen der Aleglitazarbehandlung auf die Endothelfunktion

Die endothelabhängige und –unabhängige Relaxation wurde zur Analyse der Gefäßfunktion an isolierten Aortensegmenten in Organbadexperimenten getestet (siehe Kapitel 3.2.11). Die Aortensegmente stammten aus ApoE^{-/-}-Mäusen, die mit Aleglitazar (10mg/kg KG i.p.) bzw. Kontrolllösung behandelt und mit der *Western Type*-Diät 6 Wochen lang gefüttert wurden (n=6) und unbehandelten C57Bl/6-WT-Mäusen (n=3). Unter ansteigenden Carbacholkonzentrationen kam es zu einer zunehmenden, endothelabhängigen Vasodilatation der Aortenringe im Organbad. Unter der höchsten Konzentration von 100µM/l Carbachol wurde bei C57Bl/6-WT-

Tieren eine maximale Vasorelaxation auf $18 \pm 5,36\%$ der durch Vorbehandlung mit Phenylephrin maximal erreichten Vasokonstriktion ausgelöst. Im Gegensatz dazu zeigten ApoE^{-/-}-Mäuse unter der Fettfütterung eine verminderte Endothelfunktion. Die Aortenringe der ApoE^{-/-}-Mäuse der Kontrollgruppe relaxierten unter 100µM/l Carbachol lediglich auf $52 \pm 4,8\%$ der durch Phenylephrin maximal induzierten Vasokonstriktion. Die sechswöchige Behandlung mit Aleglitazar führte zu einer Verbesserung der endothelabhängigen Relaxation, bei der die Aortensegmente der ApoE^{-/-}-Mäuse der Behandlungsgruppe unter der maximalen Carbacholkonzentration (100µM/l) auf $39 \pm 5,14\%$ der durch Phenylephrin maximal induzierten Vasokonstriktion relaxierten (n=6, p<0,05) (**Abbildung 12A**).

Die Prüfung der endothelunabhängigen Vasorelaxation, die durch Glycerintrinitrat induziert wurde, war zwischen C57Bl/6-WT-Mäusen und ApoE^{-/-}-Mäusen vergleichbar und veränderte sich auch unter der Behandlung mit Aleglitazar nicht (**Abbildung 12B**).

A



B

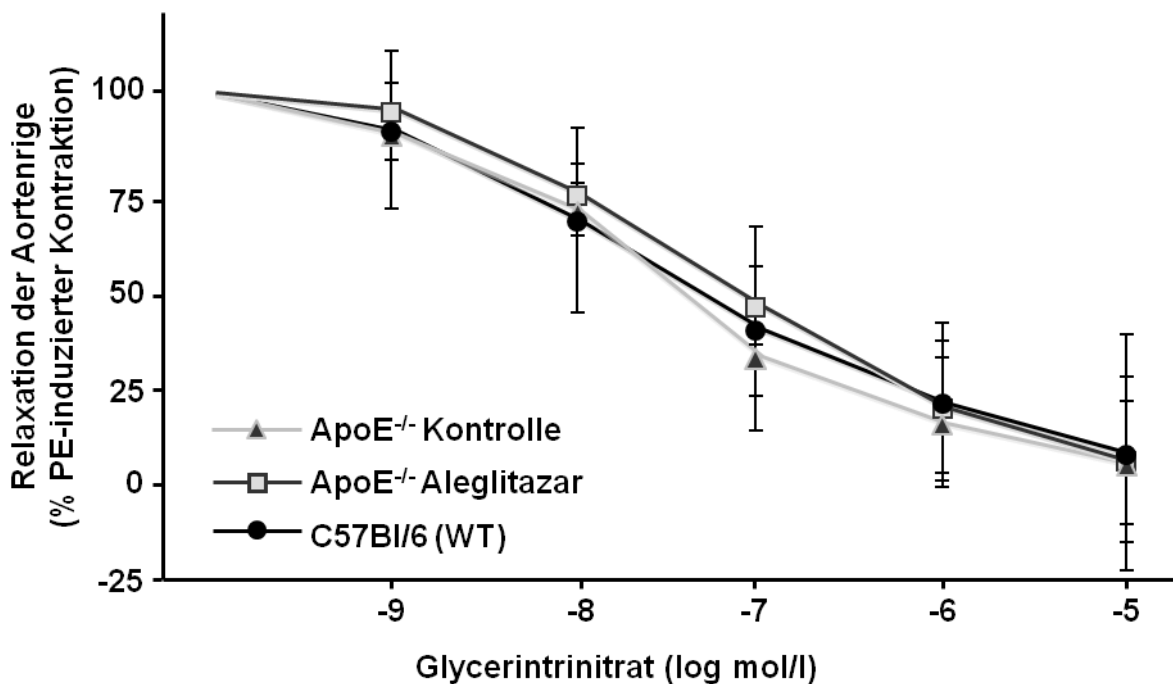


Abbildung 12:

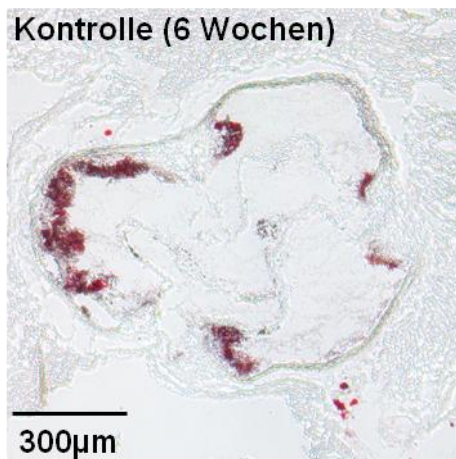
(A) Die endothelabhängige Relaxation der Aortenringe infolge steigender Carbacholkonzentrationen und (B) die endothelunabhängige Relaxation der Aortenringe infolge steigender Glycerintrinitratkonzentrationen (dargestellt als Prozentsatz der maximalen durch Phenylephrin (PE) induzierten Vasokonstriktion) bei unbehandelten C57Bl/6-WT-Mäusen (n=3), bei unbehandelten ApoE^{-/-}-Mäusen nach einer sechswöchigen *Western Type*-Diät (Kontrollen, n=6) und bei 6 Wochen mit Aleglitazar (10mg/kg KG i.p.) behandelten ApoE^{-/-}-Mäusen auf der gleichen Diät (n=6) (**p<0,001 für C57Bl/6-WT-Mäuse im Vergleich zu ApoE^{-/-}-Kontrolltieren; #p<0,05 für ApoE^{-/-}-Kontrollgruppe im Vergleich zu ApoE^{-/-}-Aleglitazargruppe).

4.1.8 Die Aleglitazarbehandlung reduziert die Bildung atherosklerotischer Läsionen in ApoE^{-/-}-Mäusen

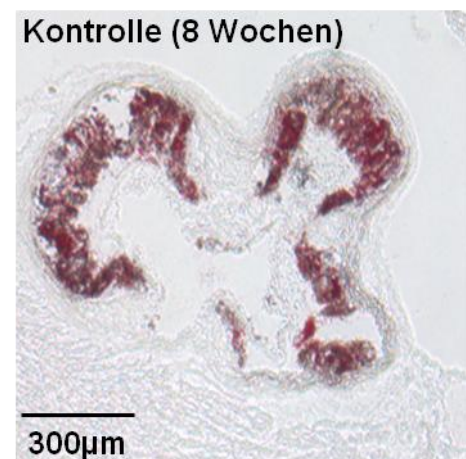
Apolipoprotein E-*Knockout*-Mäuse entwickeln auch bei einer normalen Ernährung eine Atherosklerose. Ihre Entstehung wird durch die cholesterinreiche *Western Type*-Diät stark beschleunigt. Die Ölrotfärbung der Plaques in Gefrierschnitten der Aortensinus, stammend aus ApoE^{-/-}-Mäusen auf *Western Type*-Diät mit oder ohne Behandlung mit Aleglitazar (10mg/kg KG i.p., 6 oder 8 Wochen), zeigte, dass der duale PPAR- α/γ -Agonist einer Ausbildung atherosklerotischer Plaques vorbeugen konnte. Nach einer sechswöchigen Behandlung mit Aleglitazar betrug der Anteil der

Plauefläche am Gesamtlumen des Aortensinus $2,3\pm0,8\%$ im Vergleich zu $10,1\pm1,9\%$ der unbehandelten Kontrollgruppe ($n=6$, $p<0,05$) (**Abbildung 13A/C**). In einer zweiten Untersuchung, die erst nach einer achtwöchigen Behandlungsperiode durchgeführt wurde, war dieser Effekt noch deutlicher ausgeprägt. Bei der mit Aleglitazar behandelten Tiergruppe betrug der Anteil der Plauefläche am Gesamtlumen des Aortensinus $22\pm2,2\%$, bei der Kontrolltiergruppe $36\pm2,1\%$ ($n=7$, $p<0,01$) (**Abbildung 13B/D**).

A



B



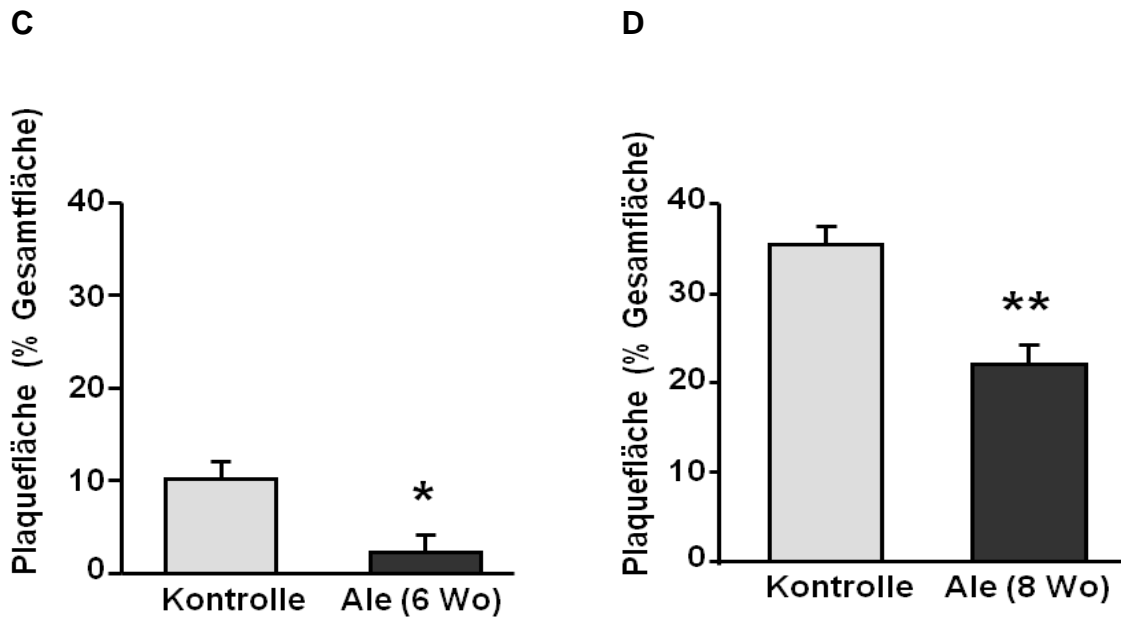


Abbildung 13:

Effekte einer sechs- oder achtwöchigen Behandlung von ApoE^{-/-}-Mäusen auf einer *Western Type*-Diät mit Aleglitazar (10mg/kg KG i.p.) auf die Ausbildung atherosklerotischer Läsionen. Repräsentative Schnitte der Aortenwurzel mit Ölrot-O angefärbten atherosklerotischen Plaques in der 40x Vergrößerung nach (A) 6 Wochen oder (B) acht Wochen Behandlung mit Aleglitazar bzw. Kontrolllösung.

(C) Histomorphometrische Quantifizierung atherosklerotischer Plaques auf Höhe des Aortensinus nach 6 Wochen (n=6, *p<0,05 im Vergleich zur Kontrolle) oder (D) nach 8 Wochen (n=7, **p<0,01 im Vergleich zur Kontrolle) täglicher i.p. Injektion von Aleglitazar bzw. Kontrolllösung. Die Plauefläche ist als prozentualer Anteil der Gesamtlumenfläche des Aortensinus dargestellt.

4.1.9 Die Aleglitazarbehandlung steigert die Expression der PPAR- α -Zielgene

Die Expression der PPAR- α -Zielgene ACO, FABP3 und CPT1 wurde mittels *real time*-PCR quantifiziert [Lee 2006; Rakhshandehroo 2010]. Hierzu wurde das Lebergewebe von ApoE^{-/-}-Mäusen auf einer *Western Type*-Diät verwendet, die 6 Wochen mit Aleglitazar (10mg/kg KG i.p.) bzw. Kontrolllösung behandelt wurden. Die Aleglitazarbehandlung führte zu einer signifikanten Hochregulation der mRNA-Expression dieser Gene: ACO auf 319 \pm 43% (n=7-8, p<0,001 im Vergleich zur Kontrolle), FABP3 auf 633 \pm 60% (n=7-8, p<0,001 im Vergleich zur Kontrolle) und CPT1 auf 133 \pm 6% (n=7-8, p<0,05 im Vergleich zur Kontrolle) (**Abbildung 14**).

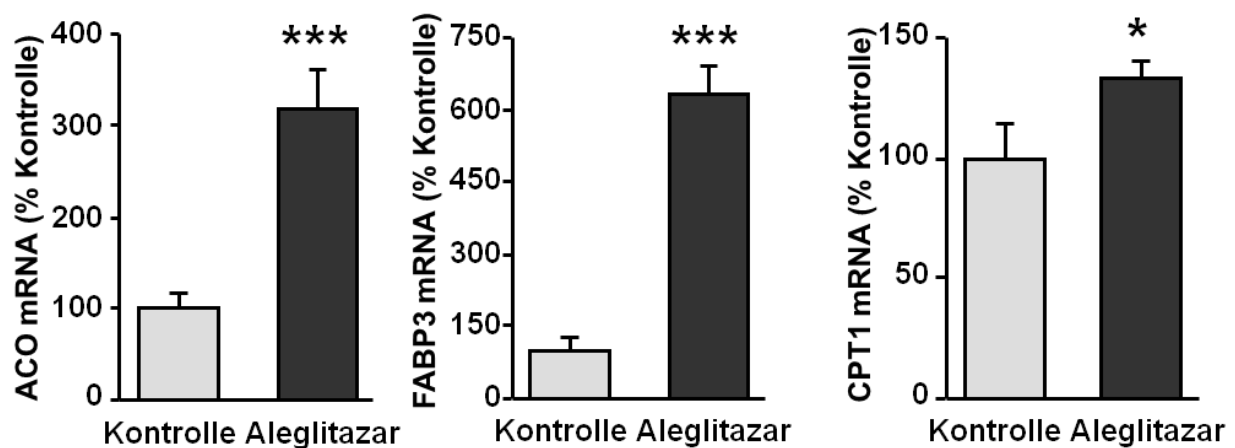


Abbildung 14:

Effekte einer sechswöchigen Behandlung von ApoE^{-/-}-Mäusen auf einer *Western Type*-Diät mit Aleglitazar (10mg/kg KG i.p. n=8) oder Kontrolllösung (n=7) auf die mRNA-Expression der PPAR- α -Zielgene ACO, FABP3 und CPT1. Die Quantifizierung erfolgte mittels einer *real time*-PCR, bei der 18s mRNA als Ladekontrolle verwendet wurde, die Auswertung der Daten unter Verwendung der *komparativen Ct* ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)-Methode (**p<0,001, *p<0,05 im Vergleich zur Kontrolle). Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt.

4.2 Ergebnisse aus Zellkulturexperimenten mit humanen endothelialen Progenitorzellen

Um zu prüfen, ob die Auswirkungen des PPAR- α/γ -Agonisten Aglelitazar in den Tierexperimenten theoretisch auf den Menschen übertragbar sein könnten, führten wir Untersuchungen an endothelialen Progenitorzellen, die aus venösem Blut gesunder Probanden gewonnen wurden, durch. Alle Experimente wurden nach einer viertägigen Differenzierung der EPC im endothelialen Basalmedium durchgeführt. Im Anschluss folgte eine Stimulation mit Aglelitazar und anderen PPAR-Liganden in verschiedenen Konzentrationen.

4.2.1 Die Aglelitazarstimulation steigert die funktionelle Kapazität der EPC

4.2.1.1 Migrationsassay

Die migratorische Kapazität der endothelialen Progenitorzellen ist ein wichtiger Parameter zur Untersuchung ihrer Funktion. Nach vier Tagen in Kultur und 24 Stunden Stimulation mit Aglelitazar in nanomolaren Konzentrationen (1nM/l-100nM/l), wurde die durch SDF-1 induzierte Migration der EPC durch die modifizierte Boyden Kammer quantifiziert. Bereits in diesen geringen Konzentrationen stieg die Anzahl der migrierten Zellen an der Unterseite des Filters der Boyden Kammer (**Abbildung 15**). Bei der Stimulation mit 1nM/l Aglelitazar wurde im Vergleich zu nicht stimulierten Kontrollen ein deutlicher Effekt beobachtet ($172,8 \pm 13,7\%$; $n=3$, $p<0,01$). Das Maximum der SDF-1-induzierten Migration von $207 \pm 17,5\%$ wurde unter der Stimulation mit 10nM/l Aglelitazar erreicht ($n=3$, $p<0,001$), das der migratorischen Kapazitätssteigerung unter der Stimulation mit 100nM/l Aglelitazar ähnelte ($198,3 \pm 28,2\%$; $n=3$, $p<0,01$).

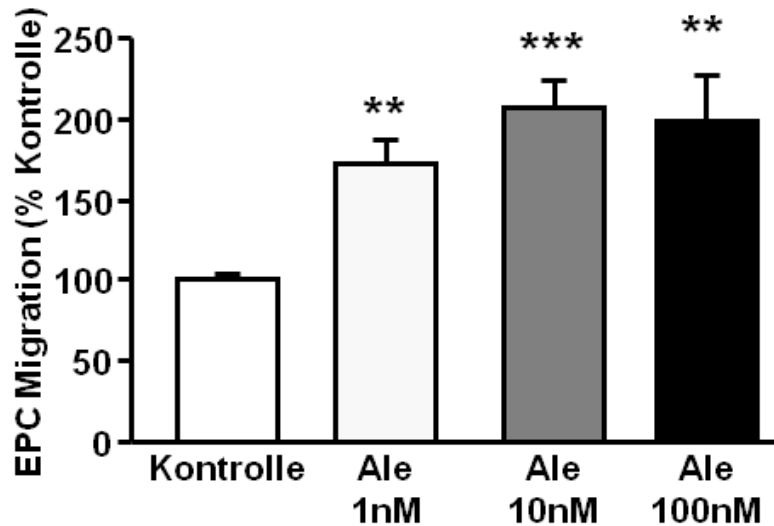


Abbildung 15:

Konzentrationsabhängige Auswirkungen der Stimulation humaner endothelialer Progenitorzellen (EPC) mit Aleglitazar (Ale 1-100nM/l, 24h) auf die SDF-1-induzierte Migration in einer modifizierten Boyden Kammer (n=3; **p<0,01, ***p<0,001 im Vergleich zur Kontrolle). Die Werte sind als Mittelwerte±SEM dargestellt.

4.2.1.2 Koloniebildende Einheiten (*colony forming units*)

Die Fähigkeit der EPC Kolonien zu bilden ist für sie charakteristisch und ein Funktionsparameter im Hinblick auf ihre klonale Expansionsfähigkeit. In diesem Experiment wurde, nach einer Differenzierung von 48 Stunden in EBM und Neuaussähen der Zellen, bis zum Zählen der koloniebildenden Einheiten (120h) mit Aleglitazar in nanomolaren Konzentrationen (1nM/l-100nM/l) stimuliert. Es zeigte sich eine Verbesserung der EPC-Funktion in Form einer Zunahme der koloniebildenden Einheiten. Bei Aleglitazarkonzentrationen geringer 0,1nM/l fehlte dieser Effekt. Das Maximum der klonogenen Potenz von 236,3±24,5% im Vergleich zu nicht stimulierten Kontrollen (n=8) wurde unter der Behandlung mit 100nM/l Aleglitazar erreicht (n=4, p<0,01), was mit der Ausbildung koloniebildender Einheiten der EPC unter 10nM/l Aleglitazar vergleichbar war (231,7±29,1%; n=5, p<0,01). Unter der Stimulation mit 1nM/l Aleglitazar kam es ebenfalls zu einer Zunahme der klonogenen Potenz der EPC (185,6±21,3%; n=7, p<0,05 im Vergleich zur Kontrolle) (**Abbildung 16**).

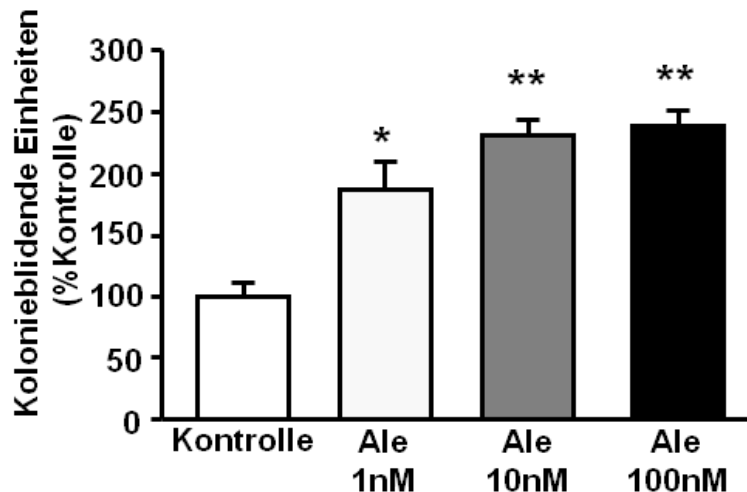


Abbildung 16:

Konzentrationsabhängige Aleglitazareffekte (1nM/l-100nM/l, 120h) auf die Anzahl koloniebildender Einheiten kultivierter humaner EPC (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ im Vergleich zur Kontrolle). Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt

4.2.2 Aleglitazareffekte auf die Apoptoserate humaner EPC

Die höhere Proliferation der EPC, die in Form der koloniebildenden Einheiten ermittelt wurde, könnte Folge eines Überlebensvorteils der EPC darstellen. Daher wurden die Effekte einer Aleglitazarbehandlung (10nM/l, 24h) auf die Apoptoserate kultivierter humaner EPC in Ab- und Anwesenheit von H_2O_2 (300 μ M/l, 24h) untersucht. Die Apoptose wurde mithilfe einer Annexin V/Propidiumiodid-FACS-Analyse quantifiziert. Hierbei wurde durch die Stimulation der Zellen mit Aleglitazar eine signifikante Reduktion der durch oxidativen Stress (H_2O_2) induzierten Apoptoserate auf $33\pm 3\%$ im Vergleich zu $47\pm 5\%$ der unbehandelten Kontrollzellen beobachtet ($n=4$, $p < 0,05$) (**Abbildung 17**).

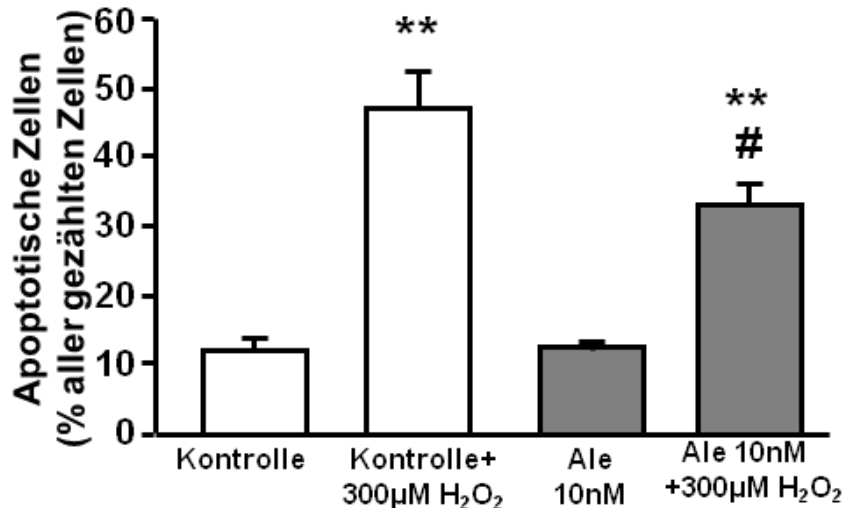


Abbildung 17:

Aleglitazareffekte (10nM/l, 24h) auf die basale und durch Wasserstoffperoxid (H₂O₂, 300µM/l, 24h) induzierte Apoptoserate kultivierter humaner EPC, gemessen mittels Annexin V/Propidium-FACS-Analyse. Die EPC-Apoptose ist als Prozentsatz Annexin V-positiver/Propidiumiodid-negativer Zellen aller gezählten Zellen (Mittelwerte ± SEM) dargestellt (n=4; **p<0,05 Kontrolle bzw. Aleglitazar 10nM/l vs. Kontrolle+300µM/l H₂O₂ bzw. Aleglitazar 10nM/l +300µM/l H₂O₂; #p<0,05 Kontrolle+300µM/l H₂O₂ vs. Aleglitazar 10nM/l+300µM/l H₂O₂).

4.2.3 Aleglitazar induziert die Expression der Telomerase und beeinflusst weitere Seneszenz-Proteine

4.2.3.1 Telomeraseaktivitätsmessung nach dem *Telomere Repeat Amplification Protocol*

Um die Frage zu beantworten, ob Aleglitazar eine Aktivitätssteigerung der Telomerase in mononukleären Zellen induziert, wurde ihre Aktivität mittels TRAP-Assay bestimmt. Nach vier Tagen Differenzierung im endothelialen Basalmedium wurden die Zellen mit Aleglitazar (10nM/l und 100nM/l, 24h) und zum Vergleich mit dem PPAR-γ-Agonisten Pioglitazon (10µM/l, 24h), von dem eine Induktion der EPC-Telomerase bekannt ist [Werner C 2011], stimuliert. Die EPC-Telomerase wurde durch die Stimulation der Zellen mit dem dualen PPAR-α/γ- Agonisten Aleglitazar in diesen sehr niedrigen Konzentrationen hochreguliert. Bei der Stimulation mit 10nM/l Aleglitazar betrug die Telomeraseaktivität im Vergleich zu den unbehandelten Zellen 155±11% (n=3, p<0,01), mit 100nM/l Aleglitazar 140±7% (n=3, p<0,05). Der PPAR-γ-

Agonist Pioglitazon, jedoch in einer Konzentration von 10µM/l, induzierte eine Steigerung der Telomeraseaktivität auf 188%±35,6% (n=3, p<0,05) (**Abbildung 18**).

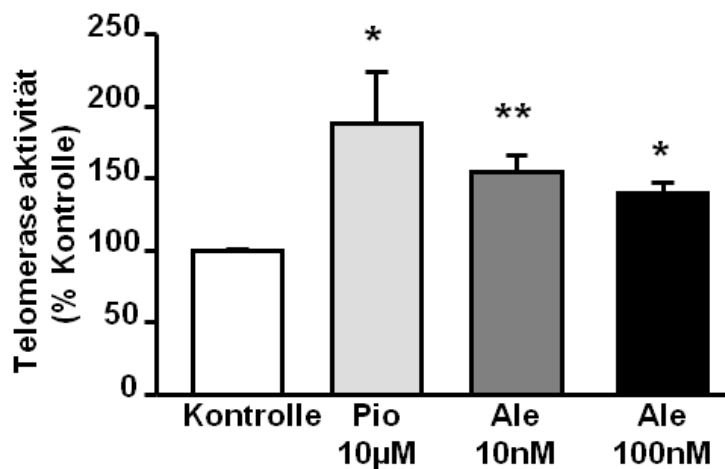


Abbildung 18:

Effekte von Pioglitazon (10µM/l, 24h) und Aleglitazar (10nM/l und 100nM/l, 24h) auf die Telomeraseaktivität in humanen EPC, die nach dem *Telomere Repeat Amplification Protocol* gemessen wurde (n=3; *p<0,05, **p<0,01 jeweils im Vergleich zur Kontrolle). Die Werte sind als Mittelwerte±SEM dargestellt.

4.2.3.2 Aleglitazar induziert die Phosphorylierung der endothelialen NO-Synthase und der Akt-Kinase sowie die Expression des antiapoptotischen Bcl-2 und reduziert die p53-Expression (Western Blot)

Es wurde beobachtet, dass der PPAR-γ-Agonist Pioglitazon die Phosphorylierung und somit Aktivierung der endothelialen NO-Synthase (eNOS) und der Akt-Kinase (Synonym Proteinkinase B) sowie die Expression des antiapoptotischen *B cell lymphoma protein-2* (Bcl-2) induziert, und die des die Apoptose regulierenden p53 reduziert [Werner C 2011]. Daher wurde nach einer viertägigen Differenzierung der Zellen in EBM nicht nur mit dem dualen PPAR-α/γ-Agonisten Aleglitazar (10nM/l und 100nM/l, 24h) stimuliert, sondern auch mit Pioglitazon (10µM/l, 24h), um die Effekte beider Substanzen auf die Proteinexpression der EPC miteinander vergleichen zu können. Die Proteinexpression wurde mittels Western Blot quantifiziert. Die densitometrisch ermittelten Werte wurden im Verhältnis zur GAPDH normiert.

Akt-Kinase/ Proteinkinase B

Die Akt-Kinase ist eine Serin/Threoninkinase, die zu den cAMP-abhängigen Proteinkinasen der G/A/C-Familie gehört. Sie fördert das Zellwachstum und verhindert die Apoptose, reguliert aber auch metabolische Reaktionen. So werden z.B. die meisten Stoffwechselwirkungen des Insulins über die Akt-Kinase vermittelt. Die Akt-Kinase wird über den Phosphatidylinositol-3'-OH-Kinase (PI3-Kinase)-Signaltransduktionsweg durch die membranständigen Lipide Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP2) und Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP3) über zugehörige Kinasen phosphoryliert und somit aktiviert [Brunet 1999; Datta 1999; Downward 1998; Song 2005]. Die Stimulation mit Aloglitazar führte zu einem signifikanten Anstieg des Anteils der phosphorylierten und somit aktivierten Akt-Kinase (pAkt) an der Gesamt-Akt-Kinase (Akt). Unter 100-nanomolarer Stimulation mit Aloglitazar kam es im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einem Anstieg der pAkt an Gesamt-Akt auf $315 \pm 49\%$ ($n=4$, $p<0,01$), unter 10-nanomolarer auf $204 \pm 23\%$ ($n=4$, $p<0,05$). Die Effekte unter der Stimulation mit Aloglitazar waren stärker ausgeprägt als unter der Stimulation mit dem reinen PPAR- γ -Agonisten Pioglitazon in 10-mikromolarer Konzentration ($169 \pm 9\%$; $n=4$, $p<0,05$) (**Abbildung 19A**).

Endotheliale NO-Synthase

Desweiteren wurden die Auswirkungen der EPC-Stimulation mit Aloglitazar hinsichtlich des Verhältnisses der phosphorylierten endothelialen NO-Synthase (peNOS) zu der nicht phosphorylierten eNOS untersucht. Die eNOS produziert Stickstoffmonoxid (NO), welches wichtige vasoprotektive und anti-atherosklerotische Effekte vermittelt. Das NO ist ein potenter Vasodilatator, der konstant zur Verminderung des Gefäßtonus und somit des Blutdrucks führt, vor Thrombozytenaggregation und -adhäsion schützt und die Leukozytenadhäsion sowie die Proliferation der glatten Gefäßmuskulatur unterdrückt. Im Gegensatz dazu wird bei atherosklerotischen Gefäßveränderungen vaskuläres NO durch Sauerstoffradikale inaktiviert, was zu einer Progression der Atherosklerose führt [Förstermann 1994 und 2006; Li H 2000]. Verschiedene Faktoren modulieren die Aktivität der eNOS. Neben der Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration, kann die eNOS auch über eine Phosphorylierung des Enzyms durch unterschiedliche Phosphokinasen reguliert werden. Unter Stimulation mit Aloglitazar in 100-nanomolarer Konzentration stieg im Vergleich zu der Kontrollgruppe der Anteil der

peNOS an der Gesamt-eNOS auf $190 \pm 16\%$ am stärksten ($n=4$, $p<0,01$). Aleglitazar in 10-nanomolarer Konzentration induzierte ebenfalls eine signifikante Phosphorylierung der eNOS ($160,5 \pm 18,9\%$, $n=4$, $p<0,05$) (**Abbildung 19B**).

Um zu prüfen, ob der duale PPAR- α/γ -Agonist einen Überlebensvorteil der EPC bewirkt, wurde die Expression des antiapoptotisch wirkenden Bcl-2 und apoptoseregulierenden p53 untersucht.

Bcl-2

Die aus pro- und antiapoptotisch wirkenden Mitgliedern bestehende Familie der Bcl-Proteine reguliert die Induktion des mitochondrialen Apoptoseweges der Zelle. Hauptmitglied und Namensgeber der Familie ist das *B cell lymphoma protein-2* (Bcl-2). Die Funktion des Bcl-2 ist also der Schutz der Zellen vor Apoptose [Rassow 2008]. Die Stimulation mit Aleglitazar in 10-nanomolarer Konzentration steigerte im Vergleich zu Kontrollen die Bcl-2-Expression auf $154,4 \pm 12,9\%$ ($n=4$, $p<0,05$) (**Abbildung 19C**).

p53

Das Protein p53 überwacht die Intaktheit der DNA und blockiert bei gravierenden DNA-Schäden den Zellzyklus, bis eine Reparatur der Schäden abgeschlossen ist oder leitet die Apoptose ein, falls die Schäden irreparabel sind. In der Zelle wird die Menge an p53 durch Ubiquitinylierung und proteolytischen Abbau niedrig gehalten. Kommt es zu einer DNA-Schädigung, werden Proteinkinasen aktiviert, die p53 phosphorylieren. Das phosphorylierte p53 kann nicht mehr abgebaut werden und stimuliert u.a. die Transkription weiterer Zellzyklusinhibitoren, die den Eintritt der Zelle in die S-Phase verhindern und somit zu einem Zyklusarrest führen, und weiteren pro-apoptotischen Proteinen (z.B. Bax) und an der Apoptose beteiligten Faktoren. Durch ihre verstärkte Expression wird die Apoptose eingeleitet [Rassow 2008]. Die Reduktion der p53-Expression auf $44 \pm 6\%$ im Vergleich zur Kontrolle war unter der Behandlung mit Aleglitazar in einer 100-nanomolaren Konzentration am stärksten ($n=4$, $p<0,01$). Unter 10nM/I Aleglitazar war ein geringerer Effekt zu beobachten ($72 \pm 9,6\%$; $n=4$, $p<0,05$ im Vergleich zur Kontrolle) (**Abbildung 19D**).

Zusammengefasst konnte also der duale PPAR- α/γ -Agonist Aleglitazar ähnliche oder sogar stärkere Effekte in kultivierten humanen EPC auf die Proteinexpression und den Phosphorylierungszustand der oben genannten, für den Überlebensvorteil relevanten, Faktoren bewirken als der reine PPAR- γ -Agonist Pioglitazon.

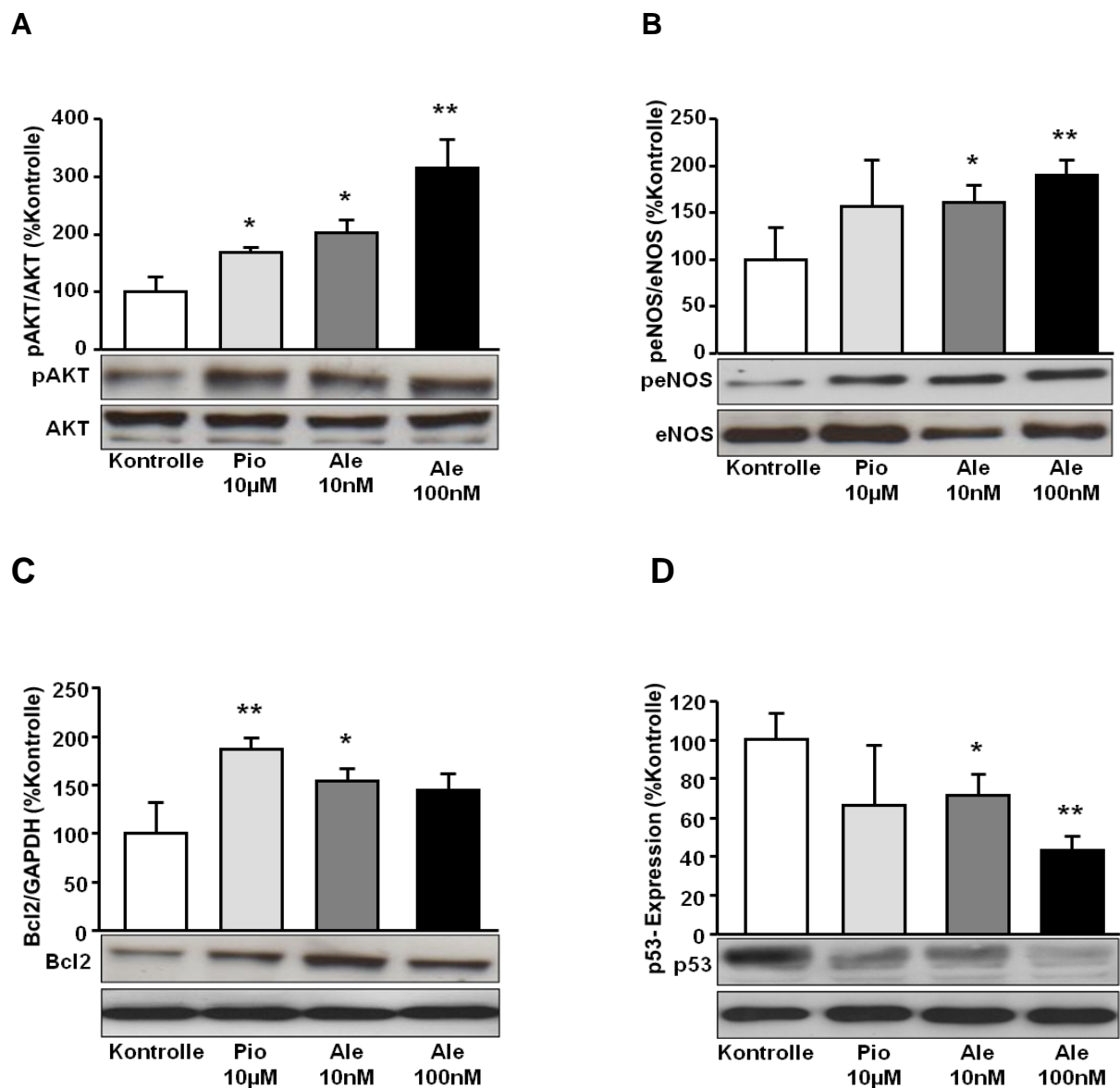


Abbildung 19:

Repräsentative Western Blots und Quantifizierung der Aleglitazareffekte (10nM/l und 100nM/l, 24h) im Vergleich zu Pioglitazon (10µM/l, 24h) auf die Proteinexpression der EPC: (A) Anteil der phosphorylierten Akt-Kinase (pAkt) an der Gesamt-Akt-Kinase-Expression, (B) Anteil der phosphorylierten endothelialen NO-Synthase (peNOS) an der Gesamt-eNOS-Expression, (C) Expression des antiapoptotischen Bcl-2 und (D) des die Apoptose regulierenden Proteins p53 (n=4; *p<0,05,**p<0,01 im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle). Alle Western Blots wurden im Verhältnis zur GAPDH normiert. Die Werte sind als Mittelwerte±SEM dargestellt.

4.2.4 PPAR- α - und PPAR- γ - Signaltransduktionswege sind beide an den Aleglitazareffekten auf die Funktion humaner EPC beteiligt

4.2.4.1 Expressionsnachweis der PPAR- α und PPAR- γ in humanen EPC

Die mRNA-Expression sowohl des PPAR- α als auch des PPAR- γ in menschlichen EPC konnte durch eine semiquantitative PCR bestätigt werden (**Abbildung 20**).

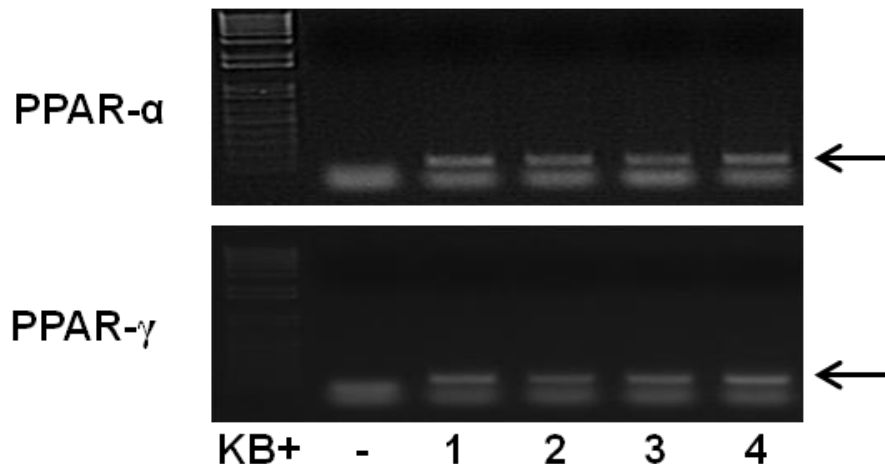


Abbildung 20:

Semiquantitative PCR zeigte die mRNA-Expression von PPAR- α und PPAR- γ in humanen EPC, die aus venösem Blut gesunder Spender (n=4) isoliert wurden.

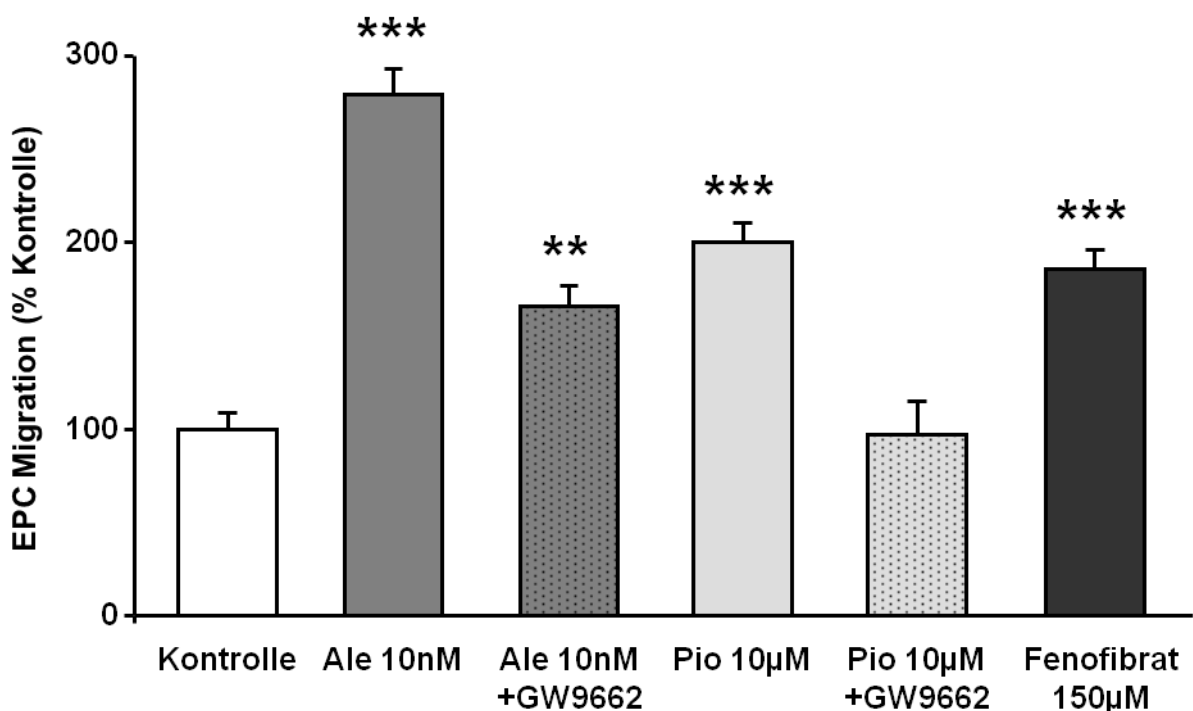
4.2.4.2 Mechanismen der durch Aleglitazar vermittelten Steigerung der EPC - Funktion

Um die Mechanismen, die hinter der durch Aleglitazar vermittelten Steigerung der EPC-Funktion stehen, zu untersuchen, wurden nach 4 Tagen im endothelialen Basalmedium differenzierte EPC gleichzeitig mit Aleglitazar (10nM/l, 24h) und dem PPAR- γ -Antagonist GW9662 (1 μ M/l, 24h) stimuliert, und mit den Effekten von Pioglitazon (10 μ M/l, 24h) und dem PPAR- α -Agonisten Fenofibrat (150 μ M/l, 24h), ebenfalls in An- und Abwesenheit von GW9662, verglichen.

Der reine PPAR- γ -Agonist Pioglitazon steigerte die Migration der EPC ($200 \pm 11\%$; n=6, p<0,001) und die Anzahl der koloniebildenden Einheiten ($166 \pm 35\%$; n=6, p<0,05) in einem ähnlichen Ausmaß wie Fenofibrat, das die Anzahl der durch die modifizierte Boyden Kammer migrierter Zellen auf $186 \pm 10\%$ (n=14, p<0,001) und der

koloniebildenden Einheiten auf $176 \pm 8\%$ ($n=6$, $p<0,01$) im Vergleich zu der jeweiligen Kontrollgruppe ($n=14$) erhöhte. Die Pioglitazoneffekte konnten durch eine gleichzeitige Inkubation mit dem PPAR- γ -Antagonist GW9662 aufgehoben werden. Der duale PPAR- α/γ -Agonist Aleglitazar vermittelte eine größere Zunahme der EPC-Migration ($279 \pm 14\%$; $n=9$, $p<0,001$) und Ausbildung kolonieformender Einheiten ($251 \pm 20\%$; $n=15$, $p<0,001$) im Bezug auf die alleinige Inkubation mit Pioglitazon oder Fenofibrat. Eine gleichzeitige Inkubation der EPC mit Aleglitazar und dem PPAR- γ -Antagonisten GW9662 reduzierte die stimulierten Effekte auf die Migration und die proliferative Kapazität der EPC. Die migratorische Kapazität stieg lediglich auf $165 \pm 12\%$ ($n=6$, $p<0,01$) und die Anzahl der koloniebildenden Einheiten auf $165 \pm 19\%$ ($n=3$, $p<0,05$) im Vergleich zur Kontrollgruppe, was in etwa den Ergebnissen der alleinigen Stimulation des PPAR- α -Signalweges entsprach (**Abbildung 21A/B**). Diese Daten deuten darauf hin, dass die kombinierte PPAR- α - und PPAR- γ -Aktivierung durch Aleglitazar zu den größeren Effekten auf die EPC-Funktion beiträgt, als bei den nur für einen Rezeptor selektiven Molekülen beobachtet werden konnte.

A



B

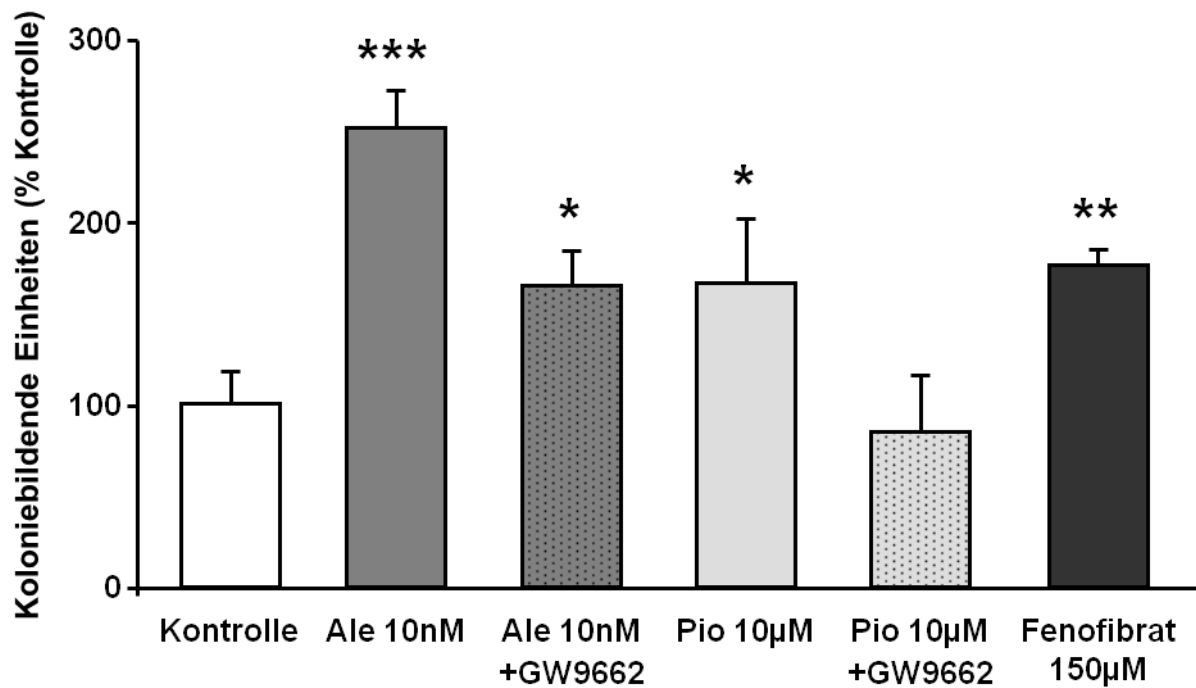


Abbildung 21:

Auswirkungen einer Stimulation humaner EPC mit Aleglitazar (10nM/l, 24h), Pioglitazon (10µM/l, 24h), Fenofibrat (150µM/l, 24h) und dem PPAR-γ-Antagonisten GW9662 (1µM/l, 24h) auf (A) die EPC-Migration in modifizierten Boyden Kammern und (B) die proliferative Kapazität in Form der Anzahl koloniebildender Einheiten (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 im Vergleich zur Kontrolle). Die Werte sind als Mittelwerte±SEM dargestellt.

5 Diskussion

Das primäre Ziel dieser Arbeit war die *in-vivo* Untersuchung der Effekte des neuen dualen *peroxisome proliferator-activated receptor* (PPAR)- α / γ -Agonisten Aleglitazar auf endotheliale Progenitorzellen (EPC), vaskuläre Funktion und Atherosklerose in C57Bl/6-WT-Mäusen und Apolipoprotein E-*Knockout*- Mäusen. Ergänzend wurden *in-vitro* kultivierte humane EPC mit Aleglitazar, reinen PPAR- α - und PPAR- γ -Agonisten sowie Antagonisten stimuliert, um zugrundeliegende Mechanismen aufzuklären und die durch PPAR- α und PPAR- γ vermittelten Effekte zu differenzieren. Wir konnten beobachten, dass die Behandlung mit Aleglitazar in gesunden C57Bl/6-WT-Mäusen und atherosklerotischen ApoE^{-/-}-Mäusen sowohl zu einer Erhöhung der EPC-Anzahl als auch zu einer Verbesserung der EPC-Funktion führt. Diese Befunde waren mit einer gesteigerten Neoangiogenese und einer verbesserten endothelabhängigen Vasodilatation, zwei wichtigen Parametern der EPC-Funktion, assoziiert. Zudem konnte der duale PPAR- α / γ -Agonist die Entwicklung atherosklerotischer Plaques hemmen. In Experimenten mit kultivierten humanen EPC steigerte Aleglitazar bereits in nanomolaren Konzentrationen ihre migratorische Kapazität, klonogene Potenz und Überlebensfähigkeit. Experimente mit einem Inhibitor, reinen PPAR- α - und - γ -Agonisten führten zu der Annahme, dass beide Rezeptorisotypen zu diesen Effekten beitragen. Die simultane Aktivierung des PPAR- α - und PPAR- γ -Signaltransduktionsweges scheint im Vergleich zu den reinen PPAR-Agonisten Pioglitazon und Fenofibrat potenter zu sein.

Bei Aleglitazar handelt es sich um einen dualen PPAR- α / γ -Agonisten, der ein hochaffiner und potenter Ligand sowohl von PPAR- α als auch von PPAR- γ ist [Bénardeau 2009; Dietz 2012; Hansen 2011]. Das Medikament befindet sich in der klinischen Entwicklung zur Behandlung von Patienten mit einer kardiovaskulären Erkrankung und einem Diabetes mellitus Typ 2.

Dual wirksame PPAR- α - und PPAR- γ -Agonisten sind von großem wissenschaftlichen Interesse, da sie eine Kombination der Blutzucker-senkenden Eigenschaften der PPAR- γ -Agonisten mit den lipid-modifizierenden Eigenschaften der PPAR- α -Agonisten ermöglichen könnten. Aleglitazar ist ein balanzierter dualer PPAR- α / γ -Agonist, der zur Kombination der PPAR-Effekte auf den Blutzuckerspiegel und das Lipidprofil entwickelt wurde. In Diabetes-Tiermodellen mit Nagetieren hat Aleglitazar

die Insulinsensitivität (Zucker fa/fa-Ratten und db/db-Mäuse) und die Zusammensetzung der Plasmalipide verbessert (humanes Apolipoprotein A1-transgene Mäuse) [Bénardeau 2009]. In einem Diabetes mellitus Typ 2-Tiermodell mit Rhesusaffen konnte die Behandlung mit Aloglitazar das HDL-Cholesterin mehr als verdoppeln und das LDL-Cholesterin und die Triglyceride signifikant reduzieren. Darüber hinaus senkte Aloglitazar bei den Rhesusaffen den Blutzucker und das HbA_{1c} [Hansen 2011]. In der SYNCHRONY-Studie, einer randomisierten Phase II-Dosisfindungsstudie, wurden diese positiven Auswirkungen einer Therapie mit Aloglitazar bei Patienten mit einem Diabetes mellitus Typ 2 ebenfalls beobachtet. Aloglitazar verbesserte dosisabhängig das HbA_{1c} und die Nüchtern-Glukose im Plasma und beeinflusste positiv das Lipidprofil der Patienten. Es senkte die Triglyceride und das LDL-Cholesterin und erhöhte das HDL-Cholesterin. In der Aloglitazargruppe konnte auch ein Rückgang der Konzentrationen der für das kardiovaskuläre Risiko relevanter Biomarker wie hochsensitives C-reaktives Protein, *plasminogen activator inhibitor-1* und Fibrinogen festgestellt werden. Während der Studiendauer von 16 Wochen war die Aloglitazartherapie für die Patienten sicher und wurde von den Patienten gut toleriert [Henry 2009]. Deshalb repräsentieren Substanzen, die die positiven Effekte des PPAR- α - und PPAR- γ -Agonismus miteinander kombinieren, einen attraktiven therapeutischen Ansatz. Allerdings gibt es auch Hinweise auf mögliche unerwünschte Effekte mit Bezug auf Ödeme, Nierenfunktion und gastrointestinale Blutungen. Welchen Einfluss Aloglitazar direkt auf vaskuläre Pathologien hat, ist jedoch noch nicht untersucht worden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden neue Erkenntnisse hinsichtlich der Effekte von Aloglitazar auf die vaskuläre Funktion einschließlich der EPC-Anzahl und EPC-Funktion, Neoangiogenese, endothelialer Funktion und Atherogenese, gewonnen.

Zur Identifizierung bzw. Definition endothelialer Progenitorzellen sind viele verschiedene Marker bzw. Markerkombinationen verwendet worden [Fadini 2012]. Wir haben die Sca-1/VEGFR-2 (entsprechend CD34/VEGFR-2 bei Menschen) doppelt positiven EPC quantifiziert, da sie ein unabhängiger Risikoprädiktor bei Patienten mit einer koronaren Herzerkrankung sind [Werner N 2005]. Zusätzlich zu den FACS-Analysen bedienten wir uns komplementärer unabhängiger Methoden zur Charakterisierung der EPC. Wir kultivierten mononukleäre Zellen in einem selektiven Wachstumsmedium und bedienten uns der Eigenschaften der EPC auf Fibronectin zu adhären, DiLDL zu phagozytieren und Lectin zu binden. Ebenso quantifizierten

wir die Ausbildung koloniebildender Einheiten der EPC, die bei Menschen mit der endothelialen Funktion korrelieren [Asahara 1997; Fadini 2012]. Aleglitazar führte in allen Experimenten, d.h. sowohl in den beiden verwendeten Mauslinien als auch in humanen EPC, zu einer Hochregulation der EPC-Anzahl. Bei der Aufklärung des potentiellen Mechanismus, über den Aleglitazar die EPC-Anzahl steigert, stellten wir fest, dass die durch reaktive Sauerstoffspezies induzierte Apoptoserate kultivierter humaner EPC deutlich reduziert war. Darüber hinaus war die Phosphorylierung der endothelialen NO-Synthase und der Überlebenskinase Akt sowie die Expression des antiapoptotisch wirkenden Bcl-2 signifikant erhöht und die Expression des die Apoptose regulierenden Proteins p53 deutlich reduziert. Weiterhin fanden wir, dass *in-vitro* durch Aleglitazar in nanomolaren Konzentrationen die EPC-Telomeraseaktivität deutlich zunahm, was die Aleglitazareffekte auf die Überlebensfähigkeit und das replikative Potenzial der EPC erklären könnte.

Zusätzlich zu der Erhöhung der EPC-Anzahl, hatten sich auch mehrere Parameter der EPC-Funktion gebessert. So konnte Aleglitazar konzentrationsabhängig die migratorische Kapazität und Proliferation der EPC steigern. Die funktionelle Kapazität der EPC spielt bei kardiovaskulären Erkrankungen eine große Rolle [Fadini 2012; Hill 2003; Werner N 2005] und wird unabhängig von der EPC-Anzahl durch kardiovaskuläre Risikofaktoren beeinträchtigt [Adams 2004; Li 2006]. Für Patienten mit einem Diabetes mellitus ist eine geminderte EPC-Funktion charakteristisch und wird unabhängig anderer kardiovaskulärer Risikofaktoren beobachtet [Sorrentino 2007; Li 2006]. Die Eigenschaften der EPC zu migrieren und zu replizieren sind zwei weitestgehend untersuchte funktionelle Charakteristika der EPC. Diese EPC-Fähigkeiten sind bedeutend für die Verbesserung der endothelialen Funktion und der Neoangionese sowie für die Hemmung der Atherogenese [Fadini 2012]. Unsere Experimente haben gezeigt, dass Aleglitazar *in-vivo* in C57Bl/6-WT- und ApoE^{-/-}-Mäusen die migratorische Kapazität der EPC und *in-vitro* in kultivierten humanen EPC zusätzlich auch ihre klonogene Potenz verbessert. Diese Ergebnisse führten uns zu der Annahme, dass die Aleglitazareffekte auf EPC größer sein könnten, als die bloße Hochregulation der EPC-Anzahl. In Übereinstimmung mit den obigen Ausführungen konnten wir in Organbadexperimenten eine Verbesserung der endothelabhängigen Vasodilatation in der Behandlungsgruppe der ApoE^{-/-}-Mäuse feststellen sowie eine gesteigerte Neoangiogenese in der Behandlungsgruppe der C57Bl/6- WT-Mäuse, zwei wichtigen Korrelaten der verbesserten EPC-Funktion.

Die Effekte der PPAR- α -Agonisten auf EPC wurden noch nicht untersucht, so dass unsere Experimente in dieser Hinsicht neue Daten bereitstellen. In unserer Studie erhöhte der reine PPAR- α -Agonist Fenofibrat sowohl die migratorische Kapazität als auch die klonogene Potenz kultivierter humaner EPC, wobei PPAR- α als ein von der Lipidsenkung unabhängiger Regulator der EPC-Funktion identifiziert werden konnte. In Übereinstimmung mit vorangehenden Studien verbesserte auch der reine PPAR- γ -Agonist Pioglitazon (in mikromolaren Konzentrationen) die EPC-Funktion [Werner C 2008 und 2011]. Der PPAR- γ -Antagonist GW9662 konnte die Pioglitazoneffekte auf die EPC-Funktion vollständig aufheben. Im Gegensatz dazu konnte GW9662 die Effekte des dualen PPAR- α/γ -Agonisten Aleglitazar (in nanomolaren Konzentrationen) nur zum Teil aufheben. Diese Beobachtungen zeigen also, dass die Aleglitazareffekte auf EPC nicht allein über PPAR- γ vermittelt werden können. In diesem Modell kultivierter humaner EPC konnte Aleglitazar tatsächlich stärkere Effekte auf die EPC-Funktion entfalten als Pioglitazon oder Fenofibrat alleine. Anhand dieser Ergebnisse nehmen wir an, dass beide PPAR an der EPC-Regulation beteiligt sind, und kommen zu dem Schluss, dass duale Agonisten des PPAR- α und PPAR- γ stärkere Effekte bewirken könnten als reine PPAR-Agonisten, die nur einen Isotyp der beiden Rezeptoren aktivieren.

Anhand der bekannten PPAR-Zielgene versuchten wir zu differenzieren, in welchem Ausmaß die Aleglitazareffekte über PPAR- α und PPAR- γ vermittelt werden. Im Lebergewebe mit Aleglitazar behandelter ApoE^{-/-}-Mäuse war die Expression mehrerer PPAR- α -Zielgene hochreguliert. Dazu gehörten die AcylCoA-Oxidase (ACO) und das *fatty acid binding protein* (FABP3), die am Lipidstoffwechsel beteiligt sind (Bildung, Hydrolyse und Bindung von AcylCoA), und die Carnitin-Palmitoyl-Transferase 1 (CPT1), die in die mitochondriale β -Oxidation und oxidative Phosphorylierung involviert ist [Rakhshandehroo 2010].

Die Konzentration des Adiponektins, eines der am besten untersuchten PPAR- γ -Zielproteine, war im Serum der mit Aleglitazar behandelten C57Bl/6-WT- und ApoE^{-/-}-Mäuse erhöht, was einen effektiven PPAR- γ -Agonismus beweist [Werner C 2007]. Adiponektin ist ein Plasmaprotein, das vor allem in den Adipozyten gebildet und von ihnen freigesetzt wird. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass es anti-atherosklerotische und Insulin-sensitivierende Eigenschaften besitzt [Higashiura 2004; Motoshima 2004; Ohashi 2012]. Der Adiponektinspiegel korreliert negativ mit dem *Body Mass Index* und hängt nicht nur mit der Insulinsensitivität zusammen,

sondern beeinflusst auch unabhängig den Lipidstoffwechsel [Higashiura 2004]. Darüber hinaus besitzt Adiponektin auch anti-inflammatorische Eigenschaften und wirkt protektiv auf die endotheliale Funktion [Choi 2011; Delaigle 2004; Higashiura 2004; Motoshima 2004; Ohashi 2012]. Auf der anderen Seite ist die Hypoadiponektinämie eng mit der Inzidenz der koronaren Herzkrankheit assoziiert. Das könnte bedeuten, dass die Hypoadiponektinämie direkt in die Pathophysiologie der Atherosklerose und indirekt durch seinen Einfluss auf die Insulinresistenz involviert ist. Die Hypoadiponektinämie ist einer der zugrunde liegenden Faktoren des Metabolischen Syndroms, das eine Schlüsselrolle in der Verbindung zwischen Insulinresistenz und Dyslipidämie mit der Atherosklerose spielt. Sie könnte also einen unabhängigen Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen darstellen [Higashiura 2004] und das Adiponektin könnte als zirkulierender Biomarker, der die vaskuläre Inflammation reflektiert, von Nutzen sein [Delaigle 2004]. *Okamoto et al.* haben gezeigt, dass erhöhte Adiponektinspiegel im Plasma von ApoE^{-/-}-Mäusen die Entwicklung und Progression der Atherosklerose unterdrücken [Okamoto 2002]. In Übereinstimmung damit konnten wir ebenfalls in unseren Experimenten in mit Aleglitazar behandelten ApoE^{-/-}-Mäusen sehen, dass Aleglitazar zu einer deutlichen Erhöhung der Adiponektinspiegel im Serum führte. Dies war mit einer signifikanten Reduktion der Ausbildung atherosklerotischer Plaques assoziiert. Eine gestörte Glukosetoleranz, die die ApoE^{-/-}-Mäuse unter der Fettfütterung entwickelt haben, wurde durch die Aleglitazarbehandlung wieder normalisiert. C57Bl/6-WT-Mäuse hatten normwertige Nüchtern- und postprandiale Glukosekonzentrationen, die durch die Aleglitazarbehandlung unverändert blieben.

Folglich konnten wir also die PPAR- α - und PPAR- γ -Aktivierung durch Aleglitazar in unserem Mausmodell bestätigen, jedoch konnten wir keine Veränderungen im Lipidprofil unserer Tiere feststellen. Dies führt zu der Annahme, dass die beobachteten Effekte des Aleglitazar in den Mäusen unabhängig von den Effekten auf den Lipidstoffwechsel aufgetreten sind. Es ist bekannt, dass PPAR viele Effekte stoffwechselunabhängig vermitteln [Berger 2005]. In unseren Zellkulturexperimenten mit EPC waren die Glukose- und Lipidkonzentrationen im Kulturmedium stets konstant. Die Expression der Rezeptoren PPAR- α und PPAR- γ in humanen EPC konnte mittels PCR bestätigt werden. Dies führte uns zu der Schlussfolgerung, dass die beobachteten Aleglitazareffekte auf humane EPC und in C57Bl/6-WT-Mäusen von der Senkung des Glukose- und Lipidspiegels unabhängig aufgetreten sind. Die

Ergebnisse unserer vorklinischen Studie geben Anlass zu der Hypothese, dass auch Patienten mit einer vaskulären Erkrankung und normaler Glukosetoleranz von einer Therapie mit dem dualen PPAR- α/γ -Agonisten Aglelitazar profitieren könnten.

Limitationen der Studie: Unsere Erkenntnisse aus den Mausmodellen und den Experimenten mit kultivierten humanen EPC erlauben uns lediglich die Aufstellung einer Hypothese und liefern einen mechanistischen Einblick in die Bedeutung der PPAR für die Regulation der EPC. Diese können aber nicht ohne klinische Studien auf den Menschen übertragen werden. Da eine Senkung des Blutzucker- und Lipidspiegels *per se* zu einer Verbesserung der EPC-Biologie führt, könnte es von Interesse sein, Aglelitazareffekte auf EPC von Patienten mit normalem Glukose- und Lipidmetabolismus zu testen, um zu bestätigen, ob unsere Ergebnisse auf den Menschen übertragbar sein könnten.

Vor fünfzehn Jahren entdeckten *Asahara et al.* die endothelialen Progenitorzellen. Diese stellen ein neues Paradigma in der Gefäßbiologie dar. Es ist bekannt, dass aus dem Knochenmark stammende adulte Stammzellen signifikant zur vaskulären Homöostase und Reparatur beitragen. Aber ihre Anzahl und noch wichtiger ihre Funktion wird durch kardiovaskuläre Risikofaktoren beeinträchtigt. Dementsprechend könnten die positiven Auswirkungen von Aglelitazar auf metabolische kardiovaskuläre Risikofaktoren und EPC einen protektiven regenerativen Mechanismus von klinischer Relevanz darstellen, von dem Patienten mit vaskulären Erkrankungen, unabhängig von Diabetes mellitus und Hypercholesterinämie, profitieren könnten.

6 Literaturnachweis

1. Adams V, Lenk K, Linke A, Lenz D, Erbs S, Sandri M, Tarnok A, Gielen S, Emmrich F, Schuler G, Hambrecht R. Increase of circulating endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease after exercise-induced ischemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24: 684-690
2. Aicher A, Heeschen C, Mildner-RIhm C et al. Essential role of endothelial nitric oxid synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat Med.* 2003; 9: 1370-1379
3. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. Nationale VersorgungsLeitlinie, Chronische KHK. Stand 1.3.2011. Eingesehen am 2.11.2012 auf http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/nvl-004I_S3_Chronische_Koronare_Herzkrankheit_Version1-3.pdf
4. Asahara T, Kawamoto A, Masuda H. Concise review: Circulating endothelial progenitor cells for vascular medicine. *Stem Cells.* 2011; 29: 1650-1655
5. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science.* 1997; 275 (5302): 964-967
6. Bailey AS, Jiang S, Afentoulis M, Baumann CI, Schroeder DA, Olson SB, Wong MH, Fleming MH. Transplanted adult hematopoietic stem cells differentiate into functional endothelial cells. *Blood.* 2004; 103: 13-19
7. Bakumar P, Rose M, Ganti SS, Krishan P, Singh M. PPAR dual agonists: are they opening Pandora's Box?. *Pharmacol Res.* 2007; 56: 91-98
8. Bénardeau A, Benz J, Binggeli A, Blum D, Boehringer M, Grether U, Hilpert H, Kuhn B, Marki HP, Meyer M, Puntener K, Raab S, Ruf A, Schlatter D, Mohr P. Aleglitazar, a new, potent, and balanced dual PPAR alpha/gamma agonist for the treatment of type II diabetes. *Bioorg Med Chem Lett.* 2009;19:2468-2473
9. Berger JP, Akiyama TE, Meinke PT. PPARs: therapeutic targets for metabolic disease. *Trends Pharmacol Sci.* 2005; 26: 244-251
10. Blaschke F, Takata Y, Caglayan E, Law RE, Hsueh WA. Obesity, peroxisome proliferator- activated receptor, and atherosclerosis in type-2 diabetes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006; 26: 28-40

11. Blasco MA. Telomeres and human disease: Ageing, cancer and beyond. *Nature Reviews Genetics*. 2005; 6 (8): 611-622
12. Brouillette SW, Moore JS, Mc;ahon AD, Thompson JR, Ford I, Shephers J, Packard CJ, Samani NJ. Telomere length, risk of coronary heart disease and statin treatment in the West of Scotland Primary Prevention Study: a nested case-control study. *Lancet*. 2007; 369: 107-114
13. Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS; Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*. 1999; 96: 857-868
14. Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte. Pioglitazon (Actos®, Competact®, Tandemact®): Leitfaden für die Verordnung und das Risikomanagement. 30.03.2012. Eingesehen am 1.11.2012 auf http://www.bfarm.de/DE/Pharmakovigilanz/risikoinfo/2012/RI-pioglitazon.html;jsessionid=3B3C60B8EA4B744F01E7BC81020ADDCF.1_cid332
15. Campia U, Matuskey LA, Panza JA. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation with pioglitazone improves endothelium-dependent dilatation in nondiabetic patients with major cardiovascular risk factors. *Circulation*. 2006; 113: 867- 875
16. Cavender MA; Lincoff AM. Therapeutic potential of aleglitazar, a new dual PPAR-alpha/gamma agonist: Implications for cardiovascular disease in patients with diabetes mellitus. *Am J Cardiovasc Drugs*. 2010; 10: 209-216
17. Charbonnel B. PPAR-alpha and PPAR-gamma agonists for type 2 diabetes. *Lancet*. 2009; 374: 96-98
18. Choi KM, Lee KW, Kim SG, Kim NH, Park CG, Seo HS, Oh DJ, Choi DS, Baik SH. Inflammation, insulin resistance, and glucose intolerance in acute myocardial infarction patients without a previous diagnosis of diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005 Jan; 90 (1): 175-180
19. Clegg RM, Murchie AI, Zechel A, Lilley DM. Observing the helical geometry of double-stranded DNA in solution by fluorescence resonance energy transfer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90 (7): 2994-2998
20. Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival. A Play in three Akts. *Genes Dev*. 1999; 13: 2905- 2927

21. Daiber A. Pentaerithrityltetranitrat: Oxidativer Stress, Redoxregulation und NO-Bioverfügbarkeit – experimentelle und klinische Aspekte. Vol 1. Darmstadt: Steinkopff Verlag 2006
22. Delaigle AM, Jonas JC, Bauche IB, Cornu O, Brichard SM. Induction of adiponectin in skeletal muscle by inflammatory cytokines: in vivo and in vitro studies. *Endocrinology*. 2004 Dec; 145 (12): 5589-5597
23. Dièguez C, Frühbeck G, López M. Hypothalamic lipids and the regulation of energy homeostasis. *Obes Facts*. 2009; 2 (2): 126-135
24. Dietz M, Mohr P, Kuhn B, Maerki HP, Hartmann P, Ruf A, Benz J, Grether U, Wright MB. Comparative molecular profiling of the PPAR alpha/gamma activator aleglitazar: PPAR selectivity, activity and interaction with cofactors. *ChemMedChem*. 2012; 7(6): 1101-1111
25. Dimmeler S, Aicher A, Vasa M, Mildner-Rihm C, Adler K, Tlemn M, Rutten H, Fichtlscherer S, Martin H, Zeiher AM. HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3- kinase/ Akt pathway. *J Clin Invest*. 2001; 108: 301-397
26. Downward J. Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. *Curr Opin Cell Biol*. 1998; 10: 262-267
27. Duez H, Lefebvre B, Poulain P, Torra IP, Percevault F, Luc G, Peters JM, Gonzales FJ, Gineste R, Helleboid S, Dzavik V, Fruchart JC, Fievet C, Lefebvre P, Staels B. Regulation of human apoA-I by gemfibrozil and fenofibrate through selective peroxisome proliferator-activated receptor alpha modulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005; 25: 585-591
28. Evans RM, Barish GD, Wang YX. PPARs the complex journey to obesity. *Nat Med*. 2004; 10: 355-361
29. Fadini GP, Losordo D, Dimmeler S. Critical reevaluation of endothelial progenitor cell phenotypes for therapeutic and diagnostic use. *Circ Res*. 2012; 110: 624-637
30. Fajardo LF, Kowalski J, Kwan HH, Prionas SD, Allison AC. The disc angiogenesis system. *Lab Invest*. 1988; 58: 718-724
31. Fajas L, Debril MB, Auwerx J. PPAR gamma: an essential role in metabolic control. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2001; 11: 64-69
32. Farzaneh-Far R, Cawthon MR, Na B, Browner WS, Schiller NB, Whooley MA. Prognostic value of leukocyte telomere length in patients with stable coronary

- disease: data from the Heart and Soul Study. *Arterioscler Thromb Vas Biol.* 2008; 28: 1379-1384
33. Förstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I, Kleinert H. Nitric oxide synthase isoenzymes. Characterisation, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension.* 1994; 23 (6 Pt 2): 1121-1131
 34. Förstermann U, Münzel T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation.* 2006; 113 (13): 1708-1714
 35. Frederiksen KS, Wulff EM, Sauerberg P, Mogensen JP, Jeppesen L, Fleckner J. Prediction of PPAR-alpha ligand-mediated physiological changes using gene expression profiles. *J Lipid Res.* 2004; 45 (3): 592-601
 36. Friedland SN, Leong A, Filion KB, Genest J, Lega IC, Mottillo S, Poirier P, Reoch J, Eisenberg MJ. The cardiovascular effects of peroxisome proliferator-activated receptor agonists. *The American Journal of Medicine.* 2012; 125 (2): 126-133
 37. Gensch C, Clever YP, Werner C, Hanhoun M, Böhm M, Laufs U. The PPAR-gamma agonist pioglitazone increases neoangiogenesis and prevents apoptosis of endothelial progenitor cells. *Atherosclerosis.* 2007; 192(1): 67-74
 38. Gertz K, Kronenberg G, Kälin RE, Baldinger T, Werner C, Balkaya M, Eom GD, Hellmann-Regen J, Kröber J, Miller KR, Lindauer U, Laufs U, Dirnagl U, Heppner FL, Endres M. Essential role of interleukin-6 in post-stroke angiogenesis. *Brain.* 2012; 135 (Pt 6): 1964-1980
 39. Glasser SP, Selwyn AP, Ganz P. Atherosclerosis: Risk factors and the vaascular endothelium. *Am Heart J.* 1996; 131 (2): 379-384
 40. Grant MB, May WS, Caballero, Brown GAJ, Guthrie SM, Mames RN, Byrne BJ, Vaught T, Spoerri PE, Peck AB, Scott EW. Adult hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization. *Nat Med.* 2002; 8 (6): 607-612
 41. Grundy SM, Cleeman JI, Merz CN, Brewer HB Jr, Clark LT, Hunninghake DB, Pasternak RC, Smith SC Jr, Stone NJ. Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III Guidelines. *J Am Coll Cardiol.* 2004; 44 (3): 720-732
 42. Haffner SM, Greenberg AS, Weston WM, Chen H, Williams K, Freed MI. Effect of rosiglitazone treatment on nontraditional markers of cardiovascular

- disease in patients with type 2 diabetes mellitus. *Circulation*. 2002; 106 (2): 679-684
43. Hansen BC, Tigno XT, Bénardeau A, Meyer M, Sebkova E, Mizrahi J. Effects of aleglitazar, a balanced dual peroxisome proliferator-activated receptor alpha/gamma agonist on glycemic and lipid parameters in a primate model of the metabolic syndrome. *Cardiovas Diabetol*. 2011; 10: 7
 44. Hattori K, Dias S, Heissig B, Hackett NR, Lyden D, Tateno M, Hicklin DJ, Zhu Z, Witte L, Crystal RG, Moore MA, Rafii S. Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 stimulate postnatal hematopoiesis by recruitment of vasculogenic and hematopoietic stem cells. *J Exp Med*. 2001;193 (9): 1005-1014
 45. Haubenwallner S, Essenburg AD, Barnett BC, Pape ME, DeMattos RB, Krause BR, Minton LL, Auerbach BJ, Newton RS, Leff T. Hypolipidemic activity of select fibrates correlates to changes in hepatic apolipoprotein C-III expression: a potential physiologic basis for their mode of action. *J Lipid Res*. 1995; 36 (12): 2541-2551
 46. Heeschen C, Aicher A, Lehmann R, Fichtlscherer S, Vasa M, Urbich C, Mildner-Rihm C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization. *Blood*. 2003; 102 (4): 1340-1346
 47. Henry RR, Lincoff AM, Mudaliar S, Rabbia M, Chognot C, Herz M. Effect of the dual peroxisome proliferator-activated receptor-alpha/gamma agonist aleglitazar on risk of cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes (SYNCHRONY): A phase II, randomised, dose-ranging study. *Lancet*. 2009;374 (9684): 126-135
 48. Herz M, Caspari F, Perico N, Viberti G, Urbanowska T, Rabbia M, Wieczorek Kirk D. Effects of high dose aleglitazar on renal function in patients with type 2 diabetes. *Int J Cardiol*. 2011; 151 (2): 136-142
 49. Higashi Y, Noma K, Yoshizumi M, Kihara Y. Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Circ J*. 2009; 73 (3): 411-418
 50. Higashiura K, Ura N, Ohata J, Tagashi N, Takagi S, Saitoh S, Murakami H, Tagawa Y, Shimamoto K. Correlations of adiponectin level with insulin resistance and atherosclerosis in Japanese male populations. *Clinical Endocrinology (Oxf)*. 2004 Dec; 61 (6): 753-759

51. Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, Finkel T. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med.* 2003; 348 (7): 593-600
52. Li M, Takenaka H, Asai J, Ibusuki K, Mizukami Y, Maruyama K, Yoon YS, Wecker A, Luedemann C, Eaton E, Silver M, Thorne T, Losordo DW. Endothelial progenitor thrombospondin-1 mediates diabetes-induced delay in reendothelialization following arterial injury. *Circ Res.* 2006; 98 (5): 697-704
53. Inoue I, Shino K, Noji S, Awatata T, Katayama S. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR alpha) in primary cultures of human vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998; 246 (6): 370-374
54. Jackson SM, Parhami F, Xi XP, Berliner JA, Hsueh WA, Law RE, Derner LL. Peroxisome proliferator-activated receptor activators target human endothelial cells to inhibit leukocyte-endothelial cell interaction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* Sep 1999; 19 (9): 2094-2104
55. Jung KH, Roh JK. Circulating endothelial progenitor cells in cerebrovascular disease. *J Clin Neurol.* 2008; 4 (4): 139-147
56. Kannel WB, Dawber TR, Kagan A, Revotskie N, Stokes J. Factors of risk in the development of coronary heart disease – six year follow-up experience. The Framingham study. *Ann Intern Med.* 1961; 55: 33-50
57. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science.* 1994; 266 (5193): 2011-2015
58. Kim NW, Wu F. Advances in quantification and characterization of telomerase activity by the telomeric repeat amplification protocol (TRAP). *Nucleic Acids Res.* 1997; 25 (13): 2595-2597
59. Klink R, Pape HC, Silbernagl S (Hrsg.): Lehrbuch der Physiologie, 5. Auflage. Thieme, Stuttgart 2005
60. Landmesser U, Drexler H. The clinical significance of endothelial dysfunction. *Curr Opin Cardiol.* 2005; 20 (6): 547-551
61. Laufs U, Werner N, Link A, Endres M, Wassmann S, Jürgens K, Mische E, Böhm M, Nickenig G. Physical training increases endothelial progenitor cells,

- inhibits neointima formation and enhances angiogenesis. *Circulation*. 2004; 109 (2): 220-226
62. Lee WJ, Kim M, Park HS, Kim HS, Jeon MJ, Oh KS, Koh EH, Won JC, Kim MS, Oh GT, Yoon M, Lee KU, Park JU. AMPK activation increases fatty acid oxidation in skeletal muscle by activating PPAR alpha and PGC-1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006; 340: 291-295
 63. Lenk K, Uhlemann M, Schuler G, Adams V. Role of endothelial progenitor cells in the beneficial effects of physical exercise on atherosclerosis and coronary heart disease. *J Appl Physiol*. 2011; 111: 321-328
 64. Lenski M, Kazakov A, Marx N, Böhm M, Laufs U. Effects of DPP-4 inhibition on cardiac metabolism and function in mice. *J Mol Cell Cardiol*. 2011; 51(6): 906-91
 65. Leschke M, Schwenk B, Bollinger C, Faehling M. Impaired glucose metabolism in patients with ischaemic heart disease. Clinical research in cardiology. *Official journal of the German Cardiac Society*. 2006; 95 Suppl 1: i98-102
 66. Li AC, Brown KK, Silvestre MJ, Wilson TM, Palinski V, Glass CK. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands inhibit development of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *J Clin Invest*. Aug 2000; 106 (4): 523-531
 67. Li H, Förstermann U. Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *J Pathol*. 2000; 190 (3): 244-254
 68. Libby P. Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. *Circulation*. 2001; 104 (3): 365-372
 69. Llevadot J, Murasawa S, Kureishi Y, Uchida S, Masuda H, Kawamoto A, Walsh K, Isner JM, Asahara T. HMG-CoA reductase inhibitor mobilizes bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *J Clin Invest*. 2001; 108 (3): 399-405
 70. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951; 193 (1): 265-275
 71. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*. Sep 2000; 407 (6801): 233-241
 72. Marx N, Kehrle B, Kohlhammer K, Grüb M, Koenig W, Hombach V, Libby P, Plutzky J. PPAR activators as antiinflammatory mediators in human T

- lymphocytes: implications for atherosclerosis and transplantation-associated arteriosclerosis. *Circ Res.* Apr 2002; 90 (6): 703-710
73. Marx N, Mackman N, Schonbeck U, Yilmaz N, Hombach V, Libby P, Plutzky J. PPARalpha activators inhibit tissue factor expression and activity in human monocytes. *Circulation.* 2001; 103:213-219
 74. Marx N, Sukhova GK, Collins T, Libby P, Plutzky J. PPARalpha activators inhibit cytokine-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression in human endothelial cells. *Circulation.* 1999; 99: 3125-3131
 75. Meisner F, Walcher D, Gizard F, Kapfer X, Huber R, Noak A, Sunder-Plassmann L, Bach H, Haug C, Bachem M, Stojakovic T, Marz W, Homach V, Koenig W, Staels B, Marx N. Effect of rosiglitazone treatment on plaque inflammation and collagen content in nondiabetic patients: data from a randomized placebo-controlled trial. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006; 26 (4): 845-850
 76. Moreno PR, Sanz J, Fuster V. Promoting mechanisms of vascular health: circulating progenitor cells, angiogenesis, and reverse cholesterol transport. *J Am Coll Cardiol.* 2009; 53 (25): 2315-2323
 77. Motoshima H, Wu X, Mahadev K, Goldstein BJ. Adiponectin suppresses proliferation and superoxide generation and enhances eNOS activity in endothelial cells treated with oxidized LDL. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Mar 5; 315 (2): 264-271
 78. Nissen SE, Wolski K, Topol EJ. Effect of muraglitazar on death and major adverse cardiovascular events in patients with type 2 diabetes mellitus. *JAMA.* 2005; 294 (20): 2581- 2586
 79. Ohashi K, Ouchi N, Matsuzawa Y. Anti-inflammatory and anti-atherogenic properties of adiponectin. *Biochimie.* 2012; 94 (10): 2137-2142
 80. Okamoto Y, Kihara S, Ouchi N, Nishida M, Arita Y, Kumada M, Ohashi K, Sakai N, Shimomura I, Kobayashi H, Terasaka N, Inaba T, Funahashi T, Matsuzawa Y. Adiponectin reduces atherosclerosis in apolipoproteinE-deficient mice. *Circulation.* 2002 Nov 26; 106 (22): 2767-2770
 81. Oyekan A. PPARs and their effects on the cardiovascular system. *Clin Exp Hypertens.* 2011; 33 (5): 287-293
 82. Park S, Tepper OM, Galiano RD, Capla JM, Baharestani S, Kleinman ME, Pelo CR, Levine JP, Gurtner GC. Selective recruitment of endothelial

- progenitor cells to ischemic tissues with increased neovascularization. *Plast Reconstr Surg.* 2004; 113 (1): 284-293
83. Pelosi E, Valtieri M, Coppola S, Botta R, Gabbianelli M, Lulli V, Marziali G, Masella B, Müller R, Sgadari C, Testa U, Bonanno G, Peschle C. Identification of the hemangioblast in postnatal life. *Blood.* 2002; 100 (9): 3203-3208
 84. Pöss J, Werner C, Lorenz D, Gensch C, Böhm M, Laufs U. The renin inhibitor aliskiren upregulates pro-angiogenic cells and reduces atherogenesis in mice. *Basic Res Cardiol.* 2010; 105(6): 725-735
 85. Powell TM, Paul JD, Hill JM, Thompson M, Benjamin M, Rodrigo M, McCoy JP, Read EJ, Khuu HM, Leitman SF, Finkel T, Cannon RO 3rd. Granulocyte colony-stimulating factor mobilizes functional endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25 (2): 296-301
 86. Pourcet B, Fruchart JC, Staels B, Glineur C. Selective PPAR modulators, dual and pan agonists : multimodal drugs for the treatment of type 2 diabetes and atherosclerosis. *Expert Opin Emerg Drugs.* 2006; 11(3): 379-401
 87. Rakhshandehroo M, Knoch B, Müller M, Kersten S. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes. *PPAR Res.* 2010; Vol. 2010
 88. Rassow J, Hauser K, Netzer R, Deutzmann R. Duale Reihe Biochemie. Thieme Verlag Stuttgart 2008; 2.Auflage: 526-527
 89. Rehmann J et al. Peripheral blood „endothelial progenitor cells“ are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation.* 2003; 107 (8): 1164-1169
 90. Ricote M, Li AC, Wilson TM, Kelly CJ, Glass CK. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature.* Jan 1998; 391(6662): 79-82
 91. Risau W, Sariola H, Zerwes, Sasse J, Eckblom P, Kemler R, Doetschman T. Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic-stem-cell-derived embryoid bodies. *Development.* 1988; 102 (3): 471-478
 92. Rösen P. Endotheliale Dysfunktion: ein Synonym für funktionelle Atherosklerose. *Journal of Cardiology.* 2002; 9 (12): 556-562
 93. Rosenberger G, Fichtlscherer S. Analysis of forearm circulation- a substitute for diagnosis of coronary atherosclerosis?. *Herz.* 1998; 23 (2): 130-134

94. Roumen KJ, Corpeleijn E, Feskens EJM, Mensink M, Saris WHM, Blaak EE. Impact of 3-year lifestyle intervention on postprandial glucose metabolism: the SLIM Study. *Diabet Med.* 2008; 25 (5): 597-605
95. Sanwald-Ducray P, Liogier D'ardhuy X, Jamois C, Banken L. Pharmacokinetics, pharmacodynamics, and tolerability of aleglitazar in patients with type 2 diabetes: Results from a randomized, placebo-controlled clinical study. *Clin Pharmacol Ther.* 2010; 88 (2): 197-203
96. Schächinger V, Zeiher AM. Quantitative assessment of coronary vasoreactivity in humans in vivo. Importance of baseline vasomotor tone in atherosclerosis. *Circulation.* 1995; 92 (8): 2087-2094
97. Schultze AE, Alborn WE, Newton RK, Konrad RJ. Administration of a PPARalpha agonist increases serum apolipoprotein A-V levels and the apolipoprotein A.V/apolipoprotein C-III ratio. *J Lipid Res.* 2005; 46 (8): 1591-1595
98. Sethi S, Ziouzenkova O, Ni H, Wagner DD, Plutzky J, Mayadas TN. Oxidized omega-3 fatty acids in fish oil inhibit leukocyte-endothelial interactions through activation of PPAR alpha. *Blood.* 2002; 100 (4): 1340-1346
99. Shantsila E, Watson T, Lip GY. Endothelial progenitor cells in cardiovascular disorders. *J Am Coll Cardiol.* 2007; 49 (7): 741-752
100. Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Honma T, Katoh A, Sasaki K, Shimada T, Oike Y, Imaizumi T. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation.* 2001; 103 (23): 2776-2779
101. Sixt S, Rastan A, Desch S, Sonnabend M, Schmidt A, Schuler G, Niebauer J. Exercise training but not rosiglitazone improves endothelial function in prediabetic patients with coronary disease. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* 2008; 15 (4): 473-478
102. Song G, Ouyang G, Bao S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med.* 2005; 9 (1): 59-71
103. Sorrentino SA, Bahlmann FH, Besler C, Muller M, Schulz S, Kirchhoff N, Doerries C, Horvath T, Limbourg A, Limbourg F, Fliser D, Haller H, Drexler H, Landmesser U. Oxidant stress impairs in vivo reendothelialization capacity of endothelial progenitor cells from patients with type 2 diabetes mellitus:

Restoration by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone. *Circulation*. 2007;116 (2):163-173

104. Statistisches Bundesamt. Gesundheit-Todesursachen in Deutschland 2010. Statistisches Bundesamt, Wiesbaden 2012; Fachserie 12 Reihe 4: 1
105. Strehlow K, Werner N, Berweiler J, Link A, Dirnagl U, Priller J, Laufs K, Ghaeni L, Milosevic M, Böhm M, Nickenig G. Estrogen increases bone marrow-derived endothelial progenitor cells production and diminishes neointima formation. *Circulation*. 2003; 107 (24): 3059-3065
106. Takahashi, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, Magner M, Isner JM, Asahara T. Ischemia- and cytokine-induced mobilization and functional activation of blood-derived progenitor cells for neovascularization. *Nat Med*. 1999; 5 (4): 534-538
107. Takeda K, Ichiki T, Tokunou T, Funakoshi Y, Iino N, Hirano K, Kanaide H, Takeshita A. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators downregulate angiotensin II type 1 receptor in vascular smooth muscle cells. *Circulation*. Oct 2000; 102 (15): 1834-1839
108. Timmermans F, Van Hauwermeiren F, De Smedt M, Raedt R, Plasschaert F, De Buyzere ML, Gillebert TC, Plum J, Vandekerckhove B. Endothelial outgrowth cells are not derived from CD133+ cells or CD45+ hematopoietic precursors. *Atheroscler Thromb Vasc Biol*. 2007; 27 (7): 1572-1579
109. Tontonoz P, Hu E, Devine J, Beale EG, Spiegelman BM. PPAR gamma 2 regulates adipose expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *Mol Cell Biol*. Jan 1995; 15 (1): 351-357
110. Tse HF, Siu CW, Zhu SG, Songyan L, Zhang QY, Lai WH, Kwong YL, Nicholls J, Lau CP. Paracrine effects of direct intramyocardial implantation of bone marrow derived cells to enhance neovascularization in chronic ischaemic myocardium. *European Journal of Heart Failure*. 2007; 9 (8): 747-753
111. Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: Characterization and role in vascular biology. *Circ Res*. 2004; 95 (4): 343-353
112. Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: functional characterization. *Trends Cardiovasc Med*. 2004; 14 (8): 318-322
113. Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. Number and migratory activity of circulating endothelial

- progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res.* 2001; 89 (1): E 1-7
114. Wassmann S, Czech T, van Eickels M, Fleming I, Böhm M, Nickenig G. Inhibition of diet- induced atherosclerosis and endothelial dysfunction in apolipoproteinE/angiotensin II type 1A receptor double-knockout mice. *Circulation.* 2004; 110 (19): 3062-3067
 115. Werner C, Gensch C, Pöss J, Haendeler J, Böhm M, Laufs U. Pioglitazone activates aortic telomerase and prevents stress-induced endothelial apoptosis. *Atherosclerosis.* 2011; 216 (1): 23-34
 116. Werner C, Hanhoun M, Widmann T, Kazakov A, Semenov A, Pöss J, Bauersachs J, Thum T, Pfeundschiuh M, Müller P, Haendeler J, Böhm M, Laufs U. Effects of physical exercise on myocardial telomere-regulating proteins, survival pathways, and apoptosis. *J Am Coll Cardiol.* 2008; 52 (6): 470-482
 117. Werner C, Kamani CH, Gensch C, Böhm M, Laufs U. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist pioglitazone increases number and function of endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease and normal glucose tolerance. *Diabetes.* 2007; 56 (10): 2609-2615
 118. Werner N, Junk S, Laufs U, Link A, Walenta K, Böhm M, Nickenig G. Intravenous transfusion of endothelial progenitor cells reduces neointima formation after vascular injury. *Circ Res.* 2003; 93 (2): e17-24
 119. Werner N, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, Link A, Böhm M, Nickenig G. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med.* 2005; 353 (10): 999-1007
 120. Wong LS, de Boer RA, Samani NJ, van Veldhulsen DJ, van der Harst P. Telomere biology in heart failure. *Eur J Heart Fail.* 2008; 10 (11): 1049-1056
 121. Xavier HT. Drug combinations: statins and fibrates. *Arq Bras Cardiol.* 2005; 85 (Suppl 5): 34-35
 122. Zeiher AM, Krause T, Schächinger V, Minners J, Moser E. Impaired endothelium-dependent vasodilatation of coronary resistance vessels is associated with exercise-induced myocardial ischemia. *Circulation.* 1995; 91 (9): 2345-2352

123. Zeiher AM, Schächinger V. Coronary endothelial vasodilator dysfunction: clinical relevance and therapeutic implications. *Z Kardiol.* 1994; 83 Suppl 4: 7-14

7 Danksagung und Publikationen

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Laufs für die freundliche Überlassung des Themas und seine hervorragende wissenschaftliche Betreuung in allen Abschnitten der Durchführung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt auch den Herren Dr. med. Christian Werner und Dr. med. Christoph Gensch, die mich bei der Planung, Durchführung und Auswertung der vorliegenden Arbeit unterstützt haben und mit kreativen Ideen wesentlich zum Erstellen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. med. Michael Böhm danke ich für die Möglichkeit, die Experimente der Dissertation im Labor der III. Medizinischen Klinik der Universität des Saarlandes durchführen zu können.

Ebenso gilt mein besonderer Dank den medizinisch-technischen Assistentinnen Frau Ellen Becker, Frau Simone Jäger und Frau Jennifer Franz für die Hilfsbereitschaft und hervorragende Unterstützung bei der Durchführung der Experimente. Vor allem Frau Ellen Becker danke ich herzlich für die geduldige und sehr kompetente Einarbeitung in die Methodik, für die Unterstützung bei den technisch kniffligen invasiven Eingriffen bei Tierexperimenten und ihre Freundschaft.

Darüber hinaus möchte ich mich bei allen wissenschaftlichen Mitarbeitern/innen, Ärzten/innen und Doktoranten/innen für die ständige Hilfsbereitschaft und das schöne Arbeitsklima bedanken.

Folgende Abstracts wurden auf nationalen/ internationalen Kongressen präsentiert:

- 1) Gensch C, **Pavlickova V**, Pöss J, Lorenz D, Werner C, Laufs U, Böhm M. The balanced affinity dual PPAR- α/γ agonist aleglitazar up-regulates endothelial progenitor cells and reduces atherogenesis in mice. *78. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie-Herz- und Kreislaufforschung e.V.* 2012; P 377
- 2) Gensch C, Pöss J, **Pavlickova V**, Böhm M, Laufs U. The balanced dual PPAR-alpha/gamma agonist aleglitazar up-regulates endothelial progenitor cells, enhances endothelial vasodilatation and reduces atherogenesis in mice. *European Heart Journal*. 2012; 33 (Abstract Supplement), 198
- 3) **Pavlickova V**, Werner C, Gensch C, Pöss J, Wright MB, Böhm M, Laufs U. Der duale PPAR- α/γ -Agonist Aleglitazar steigert Anzahl und Funktion endothelialer Progenitorzellen, verbessert Neoangiogenese und vaskuläre Funktion und hemmt die Atherogenese in Mäusen. *119. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin e.V.* 2013; P 208

Publikation:

Werner C, Gensch C, **Pavlickova V**, Pöss J, Wright MB, Böhm M, Laufs U. The dual PPAR- α/γ agonist aleglitazar increases number and function of endothelial progenitor cells: implications for vascular function and atherogenesis. *J Am Coll Cardiol*, under revision

8 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Valérie Pavlicek
Geburtsname	Valérie Pavlíčková
Geburtsdatum	14.12.1979
Geburtsort	Ostrava, Tschechien
Familienstand	ledig
Eltern	Herr Dipl. Ing. Vlastimil Pavlíček Frau Dipl. Ing. Vladimíra Pavlíčková
Geschwister	Frau Dipl. Jur. Irena Pavlicek

Schulbildung

1986 - 1990	Grundschule in Ostrava, Tschechien
1990 - 1997	Saar-Pfalz-Gymnasium Homburg
1997 - 1999	Heinrich-Heine-Gymnasium Kaiserslautern Abschluss: Abitur

Berufsfindungsphase

06/1999 – 08/1999	Pflegepraktikum am Universitätsklinikum des Saarlandes, II. Medizinische Klinik, Station M2-03
12/1999 – 03/2000	Ferienarbeiterin in der Firma Bosch, Homburg

Berufsausbildung

04/2000 – 03/2003	Krankenpflegeschule am St. Johannis Krankenhaus Landstuhl Abschluss: Krankenschwester
-------------------	---

Berufliche Tätigkeit

03/2003 - dato Krankenschwester am Universitätsklinikum des Saarlandes, III. Medizinische Klinik, Station M3-04

Studium

03/2004 – 04/ 2007 Diplomstudiengang (VWA Mannheim)
Betriebswirtschaft
Schwerpunkt: Gesundheitsmanagement
Abschluss: Dipl. Betriebswirtin (VWA)

10/2008 - dato Studium der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes

08/ 2010 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

01/2011- 11/2012 Experimentelle Doktorarbeit bei Prof.Dr.med. Ulrich Laufs in der III. Medizinischen Klinik des Universitätsklinikums des Saarlandes

04/ 2013 Abgabe der Doktorarbeit im 10. Fachsemester

Stipendium

10/2009 - dato Aufstiegsstipendium der SBB (Stiftung Begabtenförderung berufliche Bildung gGmbH)